



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Instituto de Biotecnología

**Caracterización de mutantes de rotavirus con cambios en la proteína  
no estructural NSP3**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Lic. Viviana Andrea Barragán Torres

TUTORA PRINCIPAL:  
Dra. Susana López Charretón  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL:  
Dra. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dra. Rosa María del Ángel  
CINVESTAV, IPN

Cuernavaca, Morelos; Septiembre del 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Susana López Charretón y contó con el apoyo del donativo A1-S-15356 de CONACYT. La alumna Viviana Andrea Barragan Torres recibió una beca CONACYT para realizar sus estudios de maestría.

Jurado designado para el examen de grado:

- Dr. Ramón González (CIDC-UAEM)
- Dra. Leonor Pérez (MMBp-IBT)
- Dra. Lorena Gutiérrez (CINVESTAV-IPN)
- Dr. Juan Ernesto Ludert (CINVESTAV-IPN)
- Dr. José Luis Reyes (BMP-IBT)

### Agradecimientos técnicos

El autor de esta tesis agradece a la asesoría y el excelente apoyo de técnico proporcionado por el M. en C. Marco Antonio Espinoza y la Q.B.P. Rafaela Espinosa durante el desarrollo del presente trabajo.

# Índice

	<i>Página</i>
<i>Abreviaturas</i>	5
<i>Índice de figuras</i>	6
<i>Índice de tablas</i>	8
<i>Resumen</i>	9
<i>Abstract</i>	10
<i>Introducción</i>	11
1. <i>Situación epidemiológica actual de rotavirus</i>	11
1.1. <i>Situación a nivel mundial</i>	11
1.2. <i>Situación en México</i>	12
2. <i>Gastroenteritis por rotavirus</i>	13
2.1. <i>Cuadro Clínico</i>	13
2.2. <i>Diagnóstico</i>	13
2.3. <i>Tratamiento</i>	14
3. <i>Rotavirus: Estructura y generalidades</i>	14
3.1. <i>Genoma</i>	14
3.2. <i>Proteínas virales y su función</i>	15
3.3. <i>Ciclo replicativo</i>	17
4. <i>Proteína no estructural NSP3</i>	19
5. <i>Traducción de proteínas celulares</i>	20
5.1. <i>Traducción de proteínas durante la infección por rotavirus</i>	21
6. <i>Sistema de genética reversa para rotavirus</i>	22
7. <i>Estudio in-silico de proteínas</i>	24
7.1. <i>Modelado de proteínas</i>	25
7.2. <i>Docking molecular</i>	25
7.3. <i>Softwares y servidores</i>	26
<i>Antecedentes</i>	28
<i>Hipótesis</i>	31
<i>Objetivos</i>	31
<i>Materiales y métodos</i>	32
<i>Células y virus</i>	32
<i>Plásmidos</i>	32

<i>Infección</i>	33
<i>Obtención de lisados virales con títulos altos</i>	33
<i>Electroferotipo</i>	33
<i>Ensayo de progenie viral</i>	34
<i>Determinación del título viral por formación de focos por inmunoperoxidasa</i>	34
<i>Marcaje radiactivo de proteínas</i>	34
<i>Western Blot</i>	35
<i>Formación de placas</i>	35
<i>Evaluación in-silico de mutantes de NSP3</i>	36
<i>Análisis estadístico</i>	36
<i>Resultados</i>	37
<i>Obtención de lisados virales con títulos altos</i>	37
<i>Electroferotipo</i>	37
<i>Ensayo de progenie viral</i>	38
<i>Marcaje radiactivo de proteínas</i>	38
<i>Expresión de proteínas virales</i>	39
<i>Formación de placas</i>	40
<i>Evaluación in-silico de mutantes de NSP3</i>	41
<i>Discusión</i>	52
<i>Conclusiones</i>	55
<i>Perspectivas</i>	56
<i>Bibliografía</i>	57

## Abreviaturas

<b>DNAc</b>	<i>ADN complementario</i>
<b>DLP</b>	<i>Partícula de doble capa de rotavirus</i>
<b>dsRNA</b>	<i>RNA bicatenario</i>
<b>eIFs</b>	<i>Factores eucariotas de inicio de la traducción</i>
<b>mRNA</b>	<i>RNA mensajero</i>
<b>MOI</b>	<i>Multiplicidad de infección</i>
<b>NSP</b>	<i>Proteína no estructural</i>
<b>OMS</b>	<i>Organización mundial de la salud</i>
<b>PABP</b>	<i>Proteína de unión a cola de poli-Adeninas</i>
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PPI</b>	<i>Interacciones proteína-proteína</i>
<b>RE</b>	<i>Retículo endoplásmico</i>
<b>RV</b>	<i>Rotavirus</i>
<b>RVA</b>	<i>Rotavirus del grupo A</i>
<b>SFB</b>	<i>Suero fetal bovino</i>
<b>TC</b>	<i>Complejo ternario</i>
<b>TLP</b>	<i>Partícula infecciosa de rotavirus de triple capa</i>

## Índice de figuras

	<i>Página</i>
<b>Figura 1.</b> Países con mayor número de muertes por RV en niños menores de 5 años en el año 2013	12
<b>Figura 2.</b> Número de muertes relacionadas con diarrea en niños menores de 5 años desde julio de 2002 hasta diciembre de 2011 en México según el grupo de edad	12
<b>Figura 3.</b> Estructura y proteínas de las TLPs.	16
<b>Figura 4.</b> Ciclo replicativo de RV	19
<b>Figura 5.</b> Esquema de los dominios del homodímero de NSP3	20
<b>Figura 6:</b> Modelo de la interacción de mRNA para el inicio eficiente de su traducción	21
<b>Figura 7.</b> Desplazamiento de PABP de su sitio de unión a eIF4G por NSP3	22
<b>Figura 8.</b> Sistema de genética reversa para RV	23
<b>Figura 9.</b> Monorrearreglante de rotavirus	24
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de secuencias de la proteína NSP3 codificada por SA11 y RRV	29
<b>Figura 11.</b> Plásmidos de NSP3 mutantes en sus dominios de interacción	32
<b>Figura 12.</b> Proceso para la evaluación in-silico de mutantes de NSP3	36
<b>Figura 13.</b> Electroferotipo de lisados virales	37
<b>Figura 14.</b> SA11/RRVNSP3 es similar en su crecimiento a SA11, el virus que aporta su fondo genético	38
<b>Figura 15.</b> SA11/RRVNSP3 no difiere de los virus parentales en cuanto al fenotipo de apagado de la síntesis de proteínas celulares	39
<b>Figura 16.</b> SA11/RRVNSP3 no difiere de sus virus parentales en cuanto a la expresión de proteínas virales	40

<b>Figura 17.</b> SA11/RRVNSP3 genera un fenotipo de placa similar a SA11, el virus que aporta su fondo genético	41
<b>Figura 18.</b> Modelo del dominio C-Terminal de NSP3 silvestre de RRV.	42
<b>Figura 19.</b> Modelo del dominio N-terminal de NSP3 silvestre de RRV	43
<b>Figura 20.</b> Modelo del dominio C-terminal de NSP3 con delección en el dominio de unión a eIF4G (Delta4G)	43
<b>Figura 21.</b> Modelo del dominio N-terminal de NSP3 con delección en el dominio de unión a RNA (DeltaRBD)	44
<b>Figura 22.</b> Modelo del dominio C-terminal de NSP3 mutante alternativa a la delección del dominio de unión a eIF4G (D-alternativa4G)	44
<b>Figura 23.</b> Modelo del dominio C-terminal de NSP3 con cambios puntuales en 6 aminoácidos de contacto con el factor eIF4G (6AA)	45
<b>Figura 24.</b> Los residuos Met298 y Leu302 no son importantes en la interacción de NSP3 con el factor eIF4G	46
<b>Figura 25.</b> Los residuos Phe296, Phe299, Tyr308 y Tyr 310 son relevantes en la interacción de NSP3 con el factor eIF4G	46
<b>Figura 26.</b> Análisis de mutantes de NSP3 con cambios en el dominio de interacción	47
<b>Figura 27.</b> Propuesta de delección alternativa en el dominio de unión a RNA del dímero de NSP3 (D-alternativaRBD)	48
<b>Figura 28.</b> Puntos de contacto del dímero de NSP3 con la secuencia consenso UGACC del RNA viral.	49
<b>Figura 29.</b> Propuesta de mutante alternativa con cambios puntuales en el dominio de unión a RNA de NSP3 (Alaninas).	49
<b>Figura 30.</b> Propuesta de mutante alternativa con 4 cambios puntuales en el dominio de unión a RNA de NSP3 (4AA).	50
<b>Figura 31.</b> Análisis de mutantes de NSP3 con cambios en el dominio de interacción con el RNA viral	51



## Índice de tablas

	<i>Página</i>
<b><i>Tabla 1. Genes y proteínas de rotavirus</i></b>	14
<b><i>Tabla 2. Análisis de las secuencias de las proteínas NSP3 de RRV y SA11</i></b>	30
<b><i>Tabla 3. Secuencias de los oligos empleados en la construcción de mutantes</i></b>	33
<b><i>Tabla 4. Composición de las soluciones empleadas en la realización del electroferotipo</i></b>	33
<b><i>Tabla 5. Composición del Buffer de lisis</i></b>	34
<b><i>Tabla 6. Composición del Buffer Laemmli</i></b>	35
<b><i>Tabla 7. Títulos virales</i></b>	37

## Resumen

Los rotavirus representan una de las causas más comunes de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años. Estos son virus no envueltos, miembros de la familia *Reoviridae*, que tienen un genoma de 11 segmentos de RNA bicatenario (dsRNA) que codifica para 6 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales. En nuestro laboratorio estamos interesados en caracterizar el papel que cumple la proteína no estructural NSP3 en la traducción de proteínas virales y celulares durante la infección por rotavirus.

Se sabe que en las células infectadas por rotavirus se disminuye severamente la síntesis de proteínas celulares. Este fenómeno se atribuye a la unión de NSP3 al factor de inicio de la traducción eIF4G, mediante su dominio C-terminal, y a la secuencia consenso UGACC, conservada en todos los extremos 3' de los RNA mensajeros virales, mediante su dominio N-terminal. Se sabe que estas interacciones interfieren con la traducción de los RNA mensajeros celulares y favorecen la traducción de los RNA mensajeros virales. Sin embargo, diversos estudios difieren en la importancia de la participación de NSP3 en la traducción de las proteínas virales.

El objetivo de este trabajo es caracterizar proteínas NSP3 mutantes con cambios en sus dominios de interacción con el factor eIF4G y el RNA viral. Para esto se obtuvieron 3 construcciones de NSP3 con deleciones en estas regiones, en el contexto de un sistema de genética reversa para rotavirus. Haciendo uso de estas construcciones se espera recuperar virus mutantes que permitan dilucidar el rol de los diferentes dominios de interacción de la proteína NSP3 durante la infección viral.

Inicialmente, se caracterizó el virus rearreglante que contenía la NSP3 de RRV silvestre y la proteína GFP en el fondo genético de SA11, y se encontró que este virus es un control comparable con sus virus parentales (RRV y SA11) en ensayos de síntesis de proteínas. Adicionalmente, se observó que la presencia de la NSP3 de RRV en el virus rearreglante no impacta en su replicación, ya que este crece de manera similar a SA11, el virus que aporta su fondo genético.

Las mutantes de NSP3 se evaluaron *in-silico*, en estos ensayos se evidenció que las mutantes construidas en laboratorio son deficientes en la interacción con los respectivos ligandos, de acuerdo con lo esperado. Adicionalmente se propusieron mutantes alternativas de NSP3 que pueden usarse en el sistema de genética en caso de que las deleciones originalmente diseñadas presenten dificultades en su recuperación mediante el sistema de genética reversa.

## Abstract

Rotaviruses represent one of the most common causes of acute gastroenteritis in children under 5 years of age. These are non-enveloped viruses, members of the Reoviridae family, that have 11-segment double-stranded RNA (dsRNA) genome that encodes for 6 structural proteins and 6 non-structural proteins. In our laboratory we are interested in characterizing the role of the non-structural protein NSP3 in the translation of viral and cellular proteins during rotavirus infection.

It is known that cellular protein synthesis is severely decreased in rotavirus-infected cells. This phenomenon is attributed to the binding of NSP3 to the translation initiation factor eIF4G, through its C-terminal domain, and to the consensus sequence UGACC (conserved at all 3' ends of viral messenger RNAs) through its N-terminal domain. These interactions are known to interfere with the translation of cellular messenger RNAs and promote the translation of viral messenger RNAs. However, various studies differ in the importance of the participation of NSP3 in the translation of viral proteins.

The aim of this work is to characterize mutant NSP3 proteins with changes in either their eIF4G interaction domain, or the viral RNA binding domain, using a reverse genetics system for rotavirus. Initially, we characterized the phenotypes of a reassortant virus containing the wild-type RRV NSP3 and the GFP protein in the genetic background of SA11. It was found that the recombinant reassortant virus (RRV-NSP3) had similar properties compared to its parental viruses (RRV and SA11) in protein synthesis assays. Additionally, we found that the presence of RRV NSP3 in the reassortant virus did not impact its replication properties, since it had a replication cycle similar to the SA11 parental strain.

The NSP3 mutants were evaluated in-silico, and we found that the mutants constructed in the laboratory are deficient in the interaction with the respective ligands, as expected. Additionally, based on in silico predictions we have proposed several alternative NSP3 mutants that could be useful to test in the reassortant background using the reverse genetic system.

# Introducción

## 1. Situación epidemiológica actual de rotavirus

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de enfermedad y muerte en niños menores de 5 años, especialmente en países de bajos ingresos. Se estima que las enfermedades diarreicas causan más de 500,000 muertes al año a nivel mundial<sup>1</sup>.

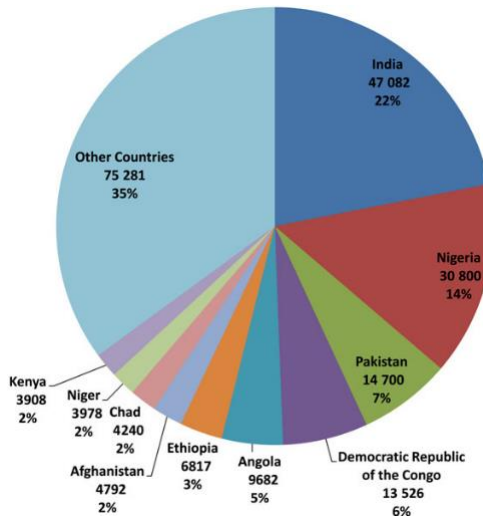
El principal agente causal de gastroenteritis aguda grave en niños menores de 5 años es rotavirus (RV)<sup>2</sup>. Solo en 2013, se estima que ocurrieron 215,000 muertes relacionadas con la gastroenteritis por rotavirus en este grupo de edad. Sin embargo, los ingresos hospitalarios y las muertes por gastroenteritis aguda han disminuido tras la creciente incorporación de las vacunas contra rotavirus en los programas nacionales de inmunización<sup>3</sup>.

### 1.1. Situación a nivel mundial

En más de 100 países de todo el mundo se encuentran aprobadas 2 vacunas contra RV (RotaTeq, Merck & Co y Rotarix, GSK Biologicals) desde el año 2006. En 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó que todos los países, y particularmente aquellos países con altas tasas de mortalidad por diarrea en niños, deben de introducir vacunas contra RV en sus programas nacionales de inmunización. A finales de 2014, más de 70 países habían incluido la vacuna contra RV en sus programas de inmunización de rutina para niños. Algunos países, incluidos México, Brasil y Panamá, han documentado disminuciones sustanciales (del 22% al 50%) en la mortalidad por diarrea en niños menores de 5 años después de la introducción de la vacuna<sup>4</sup>.

A nivel mundial, la proporción de muertes por enfermedades diarreicas debidas a rotavirus disminuyó del 43% al 37% entre el año 2000 y 2013. El número de muertes por RV durante estos 14 años disminuyó de 528,000 a 215,000. Un dato relevante, es que más del 90% de las muertes por RV en 2013 ocurrieron en 72 países de bajos y medianos ingresos; la mayoría (56%) de las muertes por RV ocurrieron en países del África subsahariana (Fig. 1)<sup>4-6</sup>.

Actualmente, el desafío prioritario es cumplir con la recomendación de la OMS de introducir vacunas contra RV en todos los países, sin excepciones, dando prioridad de financiamiento y apoyo a los países con las tasas de mortalidad más altas. Además, se debe continuar con la investigación y desarrollo de nuevas vacunas contra RV, porque aunque las actuales han funcionado bien, no se puede considerar que los niveles actuales de protección sean los óptimos, ya que desafortunadamente, la eficacia y la efectividad de la vacuna disminuyen en relación inversa con los niveles de pobreza<sup>5</sup>.

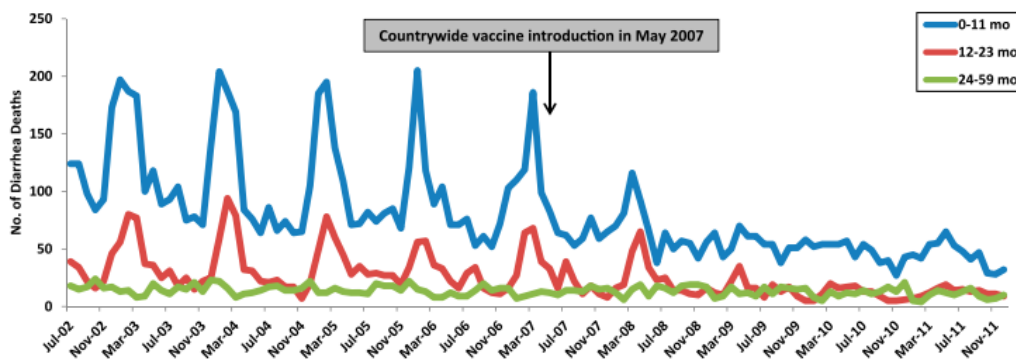


**Figura 1.** Países con mayor número de muertes por RV en niños menores de 5 años en el año 2013. Tomada de: J. E. Tate et al., "Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013," *Clin. Infect. Dis.*, 2016.

## 1.2. Situación en México

Debido al constante número de muertes y hospitalizaciones relacionadas con diarrea por RV, en 2006, México se convirtió en uno de los primeros países del mundo en introducir la vacuna monovalente contra este virus en su programa nacional de inmunización <sup>7</sup>.

En los últimos años, se ha documentado en nuestro país una disminución sustancial en las muertes infantiles por diarrea a partir de la introducción nacional de la vacuna contra RV (Figura 2). Durante 2008–2010, las muertes relacionadas con la diarrea en niños menores de 5 años disminuyeron en un 46% en relación con los niveles presentados antes de la vacuna en los años 2003 a 2006 <sup>8</sup>. Adicionalmente, la repercusión nacional de la vacuna en cuanto a disminución de hospitalizaciones y de mortalidad asociada con gastroenteritis por RV ha sido significativa<sup>9</sup>.



**Figura 2.** Número de muertes relacionadas con diarrea en niños menores de 5 años desde julio de 2002 hasta diciembre de 2011 en México según el grupo de edad (mo: months old). Tomada de: P. A. Gastañaduy et al., "Effect of rotavirus vaccine on diarrhea mortality in different socioeconomic regions of Mexico," *Pediatrics*, 2013.

## 2. Gastroenteritis por rotavirus

Rotavirus infecta enterocitos maduros (los cuales no se dividen) y células enteroendocrinas del intestino delgado, lo que sugiere que estos tipos de células expresan los factores necesarios para su infección y replicación eficiente. Después de ingresar a la célula, RV se replica y se ensambla en los viroplasmos citoplasmáticos (que son estructuras no membranosas, que se forman en las células infectadas), los virus recién producidos se liberan de las células a través de la lisis celular o de transporte vesicular no clásico independiente de Golgi. Varios estudios han demostrado que la infección por RV causa la interrupción de la homeostasis celular normal del intestino. Esta interrupción produce acortamiento y atrofia de las vellosidades, pérdida de microvellosidades e infiltración de células mononucleares <sup>1</sup>.

Debido a que las células del intestino son el principal blanco de RV, las infecciones por RV pueden provocar gastroenteritis aguda con diarrea de leve a severa, vómitos y diversos grados de deshidratación. Sin embargo, también se han reportado casos de infecciones extraintestinales en pacientes inmunosuprimidos y casos en los que la infección cursa de manera asintomática<sup>10,11</sup>.

### 2.1. Cuadro clínico

A diferencia de la gastroenteritis causada por bacterias, las infecciones por RV causan diarrea no sanguinolenta que dura un período relativamente corto y se asocia con una respuesta inflamatoria limitada, de hecho, los marcadores inflamatorios como la proteína C-reactiva en suero y la calprotectina fecal no se alteran significativamente en niños con infección por RV, de modo que la diarrea inducida por RV se considera no inflamatoria<sup>12</sup>.

Se proponen dos mecanismos para explicar la causa de la diarrea, el primero es diarrea osmótica debido a la mala absorción (secundaria al daño o muerte de los enterocitos, o a la disminución de la función de absorción epitelial), y el segundo es diarrea secretora debido a los efectos de NSP4 (enterotoxina producida por RV)<sup>1,13</sup>.

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección por RV se encuentran, temperatura corporal moderadamente elevada, diarrea y vómito, el cual está relacionado con la secreción de 5-hidroxitriptamina (serotonina) durante la infección por RV, antecede a la diarrea y dura de 3 a 5 días<sup>14</sup>. El desequilibrio electrolítico masivo debido al vomito y la diarrea conduce a menudo a deshidratación severa e insuficiencia cardiovascular que pueden provocar la muerte en pacientes infectados con RV <sup>10</sup>.

### 2.2. Diagnóstico

Aunque la infección por RV es clínicamente indistinguible de las enfermedades diarreicas causadas por otros agentes infecciosos virales y bacterianos, las infecciones por RV son a menudo más graves y de carácter estacional en algunas regiones del mundo <sup>1</sup>. El diagnóstico por laboratorio de la infección por RV se da rutinariamente por ELISA, debido a su facilidad de uso y la velocidad de obtención de resultados. Sin embargo, la RT-PCR, es altamente sensible, específica y también es adecuada para

determinar el genotipo RV circulante. Por estas razones, la RT-PCR se ha convertido en el "estándar de oro" del diagnóstico <sup>10</sup>.

### 2.3. Tratamiento

El tratamiento consiste principalmente en rehidratación oral o por vía intravenosa. No se recomienda el uso de loperamida, anticolinérgicos y adsorbentes. Se ha reportado que el racecadotril, un inhibidor de la encefalinasa que suprime el sistema nervioso entérico activado después de la infección por RV, el granisetron, un antagonista del receptor de serotonina y los antagonistas del péptido intestinal vasoactivo disminuyen la gravedad de la diarrea aguda. También, se descubrió que las soluciones orales que contienen altas concentraciones de anticuerpos contra RV son beneficiosas terapéuticamente y como medida preventiva en pacientes con gastroenteritis por RV <sup>10,15,16</sup>.

## 3. Rotavirus: Estructura y generalidades

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae* caracterizados por tener un genoma segmentado de RNA bicatenario (dsRNA), no tienen envoltura lipídica, pero tienen una estructura compleja de tres cápsides concéntricas que rodean un genoma de 11 segmentos de dsRNA. Los segmentos de RNA codifican seis proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) <sup>1,17,18</sup>.

Hay ocho grupos de RV, denominados grupos A, B, C, D, E, F, G y H. Los humanos se infectan principalmente por los grupos A, B y C, aunque más comúnmente por RV del grupo A. Dentro del rotavirus A existen diferentes serotipos, que están definidos por las proteínas de la capa más externa del virión; la glicoproteína VP7 define los serotipos G y la proteína sensible a la proteasa VP4 define los serotipos P. Debido a que los genes que determinan los tipos G y P pueden transmitirse por separado a los virus de la progenie, se pueden encontrar diferentes combinaciones <sup>19</sup>.

### 3.1. Genoma

El genoma del rotavirus consiste en 11 segmentos de dsRNA, y contiene 18,555 pares de bases en total. Cada segmento, representa un gen, numerado del 1 al 11 de mayor a menor tamaño. Cada gen codifica una proteína, excepto el gen 11, que tiene dos marcos de lectura y codifica para dos proteínas (Tabla1) <sup>18-20</sup>.

**Tabla 1.** Genes y proteínas de rotavirus

Gen	Tamaño (PB)	Proteína	Peso molecular (kDa)	Número de copias por partícula	Función
1	3,302	VP1	125	12	RNA polimerasa dependiente de RNA.
2	2,690	VP2	95	120	Unión a RNA. Formación de nucleocápside.
3	2,591	VP3	88	12	Guanilil-transferasa. Enzima capping.

4	2,362	VP4	85	120	Proteína de unión a la célula. Virulencia.
5	1,581	NSP1	53	0	Unión a 5' RNA. Antagonista del interferón.
6	1,356	VP6	45	780	Proteína estructural. Antígeno de grupo y subgrupo.
7	1,104	NSP3	34	0	Unión al factor eIF4G. Unión al 3'RNA de los mensajeros virales
8	1,059	NSP2	35	0	Actividad NTPasa. Involucrada en el empaquetamiento de RNA.
9	1,062	VP7	34	780	Glicoproteína con determinante antigénico de serotipo.
10	751	NSP4	20	0	Enterotoxina.
11	667	NSP5	26	0	Componente de los viroplasmos. Unión de RNA viral. Interacción con NSP2.
		NSP6	11	0	Unión a RNA viral.

Durante el ciclo replicativo de RV, las moléculas de RNA mensajero (mRNA) sirven como molde para la síntesis de dsRNA al interior de la nucleocápside recién ensamblada <sup>21</sup>. Las moléculas de mRNA de RV tienen secuencias UTR cortas en sus extremos 5' y 3'. En los rotavirus del grupo A (RVA), los 5'UTR varían de 9 (gen 4) a 50 nucleótidos (gen 3), y los 3'UTR varían de 17 (gen 1) a 182 nucleótidos (gen 10). Una particularidad, es que los extremos 5'UTR en RVA comienzan con una secuencia de GGCU conservada y los extremos 3'UTR terminan con la secuencia de GACC conservada <sup>22</sup>.

Otra característica del genoma de RV es que es variable, y si dos RV diferentes coinfectan una misma célula se pueden generar virus rearrreglantes con frecuencia, que son competentes en replicación, y que representan una fuente de variabilidad en esta familia de virus <sup>23</sup>. Esto se da mediante un proceso de recombinación genética que es exclusivo de los virus de ARN segmentados (reordenamiento) en el que la coinfección de una célula huésped con múltiples virus puede resultar en la mezcla de segmentos de genes generando progenie viral con nuevas combinaciones de genomas (virus rearrreglantes) <sup>24</sup>.

### 3.2. Proteínas virales y su función

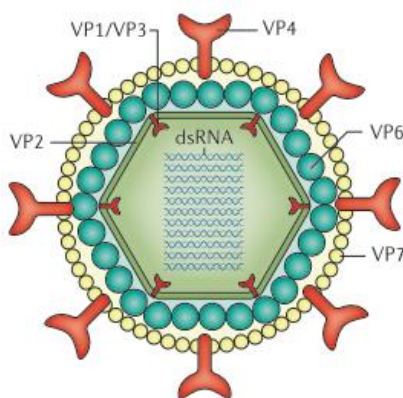
La estructura de las partículas de RV se ha descrito utilizando cristalografía de rayos X y reconstruyendo partículas individuales a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. La partícula infecciosa de triple capa (TLP) de RV tiene aproximadamente 100 nm de diámetro y se compone de las proteínas virales estructurales<sup>17</sup>.

#### *Proteínas estructurales:*

VP1 se encuentra en la nucleocápside de la partícula viral y es una enzima RNA polimerasa dependiente de RNA. En una célula infectada, esta enzima funciona como



transcriptasa generando los transcritos de mRNA para la síntesis de proteínas virales y también es la replicasa viral usando los transcritos como moldes para la síntesis del RNA genómico en las partículas de RV recién ensambladas. VP2 forma la estructura de la nucleocápside del virión y une al RNA viral, lo que facilita su ensamblaje y participa en la modulación de la actividad de VP1 al regular la actividad de transcriptasa o replicasa. VP3, al igual que VP1, se encuentra en el núcleo del virión y tiene actividad de guanilil-transferasa. Esta es la enzima que cataliza la modificación postranscripcional del cap en el extremo 5' del mRNA viral. VP6 forma la capa intermedia del virión y es altamente antigénica, puede usarse para identificar los diferentes grupos (A-H) de RV. VP4 está en la superficie del virión, formando la espícula del virus, VP4 se une a receptores en la superficie de las células y conduce a la entrada del virus. VP4 tiene que ser modificada por la proteasa tripsina, que se encuentra en el intestino, para dar lugar a VP5 y VP8, activando la infectividad del virus. VP7 es una glicoproteína que forma la superficie externa del virión. Además de sus funciones estructurales, junto con VP4, activan la respuesta inmune durante la infección por RV y median la unión del virus a la célula blanco (Figura 3)<sup>19</sup>.



**Figura 3.** Estructura y proteínas de las TLPs. Tomada de: S. E. Crawford et al., "Rotavirus infection," *Nat. Rev. Dis.* 2017.

*Proteínas no estructurales (NSP):*

Las proteínas no estructurales de RV coordinan varias etapas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral al adaptar y modificar la maquinaria celular, lo que conduce a la liberación productiva de partículas de RV maduras <sup>20,25</sup>.

NSP1, a pesar de que esta proteína parece no ser esencial para la replicación de rotavirus en células en cultivo, el papel de NSP1 es esencial para la infección ya que antagoniza la respuesta inmune innata antiviral del huésped mediante la supresión de la inducción de apoptosis durante las primeras etapas de la infección, además de participar en la especificidad del virus por su huésped <sup>25</sup>.

NSP2 participa en la formación de los viroplasmos y en la replicación y encapsidación del genoma a través de la interacción con diversas moléculas, entre ellas NSP5, VP2, VP1 y moléculas de RNA de cadena sencilla (ssRNA). Adicionalmente, NSP2 exhibe diferentes actividades enzimáticas, como actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa) dependiente de Mg<sup>2+</sup>, actividad trifosfatasa de RNA (RTPasa) y actividad de cinasa de nucleósidos difosfatos (NDP)<sup>25-28</sup>.

NSP4 es una proteína multifuncional de 175 aminoácidos, que se sintetiza como una glicoproteína y se ubica en la región transmembranal de retículo endoplásmico (RE). La forma secretada de NSP4, contiene un sitio de unión a integrina I, y está implicada en la inducción de diarrea a través de la interacción con integrina I en la membrana plasmática celular, posiblemente junto con otros receptores, lo que lleva a un aumento en calcio intracelular dependiente de fosfolipasa C y la posterior liberación de cloruro a través del canal transmembranal de cloruro activado por calcio 16A (TMEM16A). Adicionalmente, la región C-terminal de NSP4 se une a los microtúbulos y actúa como un receptor intracelular de las partículas de doble capa (DLPs) para facilitar el ensamblaje de partículas infecciosas. Otras actividades de NSP4 incluyen la interrupción de la integridad de la membrana plasmática, la inhibición de la absorción de sodio por canales de sodio epiteliales y por el transportador de glucosa/sodio 1, y la remodelación de las redes celulares de microtúbulos y actina <sup>13,25,29</sup>.

El principal papel de NSP5 es la formación de viroplasmos mediante su unión a NSP2. También, se ha demostrado que NSP5 interactúa con otras proteínas de RV como VP1, VP2 y NSP6, así como con dsRNA y ssRNA de manera independiente de la secuencia. Diversos estudios revelan que NSP5 está involucrada en la dinámica y regulación de viroplasmos y funciona como un adaptador para integrar las diversas propiedades funcionales de NSP2 con otras proteínas de RV durante la replicación y encapsidación del genoma viral <sup>25,30,31</sup>.

A diferencia de las otras proteínas no estructurales de RV, NSP6 no está codificada por todas las cepas de RV. Para aquellas cepas que expresan NSP6, ésta se traduce de un marco de lectura abierto fuera de fase en el segmento 11. Esta proteína tiene una alta tasa de recambio y se degrada en las 2 horas posteriores a su síntesis. NSP6 ha mostrado capacidad de unión a ácidos nucleicos independiente de secuencia, con afinidades similares por ssRNA y dsRNA. Sin embargo, su papel en la infección por RV no es muy claro aún <sup>25,32</sup>.

La proteína NSP3 participa en la traducción de mRNA viral y suprime la traducción de proteínas celulares mediante el antagonismo con la proteína de unión a poly A (PABP). Dado que esta proteína es el tema central de este trabajo, su función se aborda más adelante y con más detalle <sup>25</sup>.

### 3.3. Ciclo replicativo

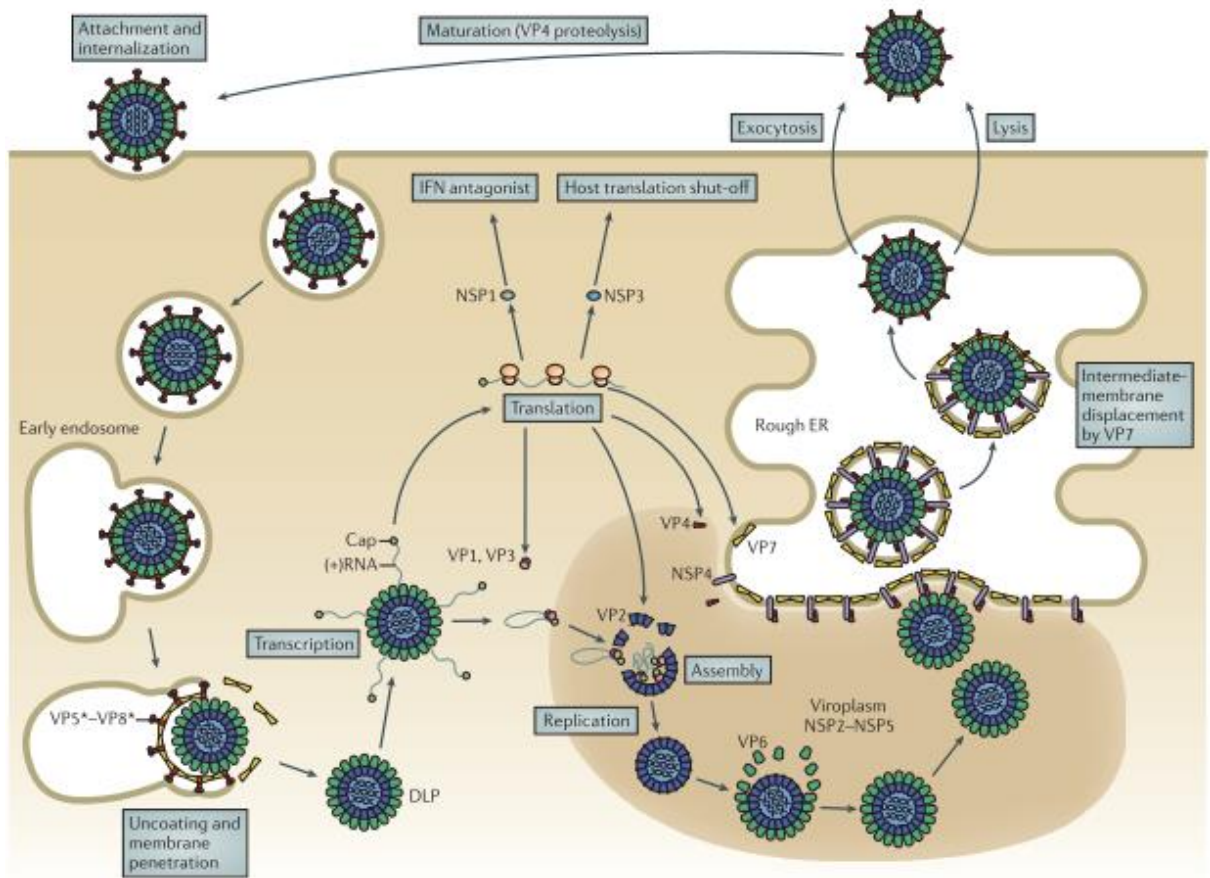
La unión de los RV a la célula es un proceso complejo y variado en el que intervienen varios dominios de las proteínas que forman la capa externa del virus y varias moléculas celulares. Inicialmente, RV se une a las células blanco mediante la interacción de VP8 (dominio de VP4) con diversos receptores dependiendo de la cepa de RV, el ácido siálico y algunos sialoglicanos, como GM1 y GD1a, han sido considerados los receptores principales. Sin embargo, se ha visto que la proteína VP8 de muchas cepas de RV humano también se puede unir a antígenos del grupo sanguíneo (HBGA) <sup>33</sup>. Después de la unión inicial, VP7 y VP5 interactúan con varios correceptores, que se concentran en balsas lipídicas para mediar la entrada del virus. VP5 participa en la unión del virus a la célula interactuando con otros receptores celulares como las

integrinas y proteína de choque térmico 70<sup>34</sup>. También se ha reportado que las proteínas de uniones celulares, como la molécula de adhesión de unión A, occludina y proteína de uniones estrechas ZO-1, pueden actuar como receptores para unión de RV<sup>35</sup>.

Dependiendo de la cepa de RV, el virus se internaliza en las células mediante vías endocíticas dependientes de clatrina, o vías independientes de clatrina e independientes de caveolina<sup>17</sup>. Una vez que la partícula viral se encuentra en el endosoma temprano, las bajas concentraciones de calcio desencadenan el desnudamiento (pérdida de VP4 y VP7) de la TLP. La pérdida de la cápside externa y la liberación de la DLP en el citosol activa el complejo interno de transcripción (VP1 y VP3) para sintetizar y agregar el cap los RNA mensajeros (de sentido positivo (+)) de cada uno de los 11 segmentos de dsRNA<sup>1</sup>.

Los RNA (+) sirven como mRNA para la síntesis de proteínas virales por los ribosomas celulares o como moldes para la síntesis del RNA de sentido negativo (-) durante la replicación del genoma. Los mRNAs virales dirigen la síntesis de todas las proteínas virales en la célula infectada. Temprano en la infección, las proteínas NSP2 y NSP5 recién sintetizadas interactúan para formar los viroplasmos que secuestran los componentes necesarios para la replicación del genoma y el ensamblaje de partículas virales<sup>17,25,30</sup>. El empaquetado del genoma se inicia cuando VP1 (y, presumiblemente, VP3) se une al extremo 3' de los RNA virales (+). Actualmente se cree que las interacciones entre las 11 moléculas de RNA (+) impulsan la formación de un complejo que contiene uno de cada uno de los segmentos del virus "sorting complex", y la condensación de la proteína de la nucleocápside, VP2, alrededor de este complejo desencadena la síntesis de dsRNA por VP1<sup>17,18,36</sup>.

La proteína de la cápside intermedia, VP6, se ensambla en el núcleo naciente de VP2 para formar la DLP. Para el ensamblaje de la cápside externa se propone que la interacción con la proteína transmembranal NSP4, recluta las DLPs y a la proteína de la cápside externa VP4 a la cara citosólica de la membrana del RE<sup>25</sup>. A través de un mecanismo indefinido, el complejo DLP - VP4 - NSP4 gema hacia el interior del RE. La posterior eliminación de la membrana del RE y NSP4 permite el ensamblaje de la proteína de la cápside externa VP7, y la formación de la TLP. Los viriones de la progenie se liberan de las células a través de lisis celular o mediante un mecanismo de transporte vesicular no clásico independiente de Golgi. La liberación expone al virión a proteasas similares a la tripsina del tracto gastrointestinal, lo que da como resultado el corte proteolítico específico de VP4 en VP5 y VP8 para producir el viriones completamente infecciosos (Figura 4)<sup>1,17,19,20</sup>.



**Figura 4.** Ciclo replicativo de RV. Tomada de: S. D. Trask, S. M. McDonald, and J. T. Patton, "Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication," *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012.

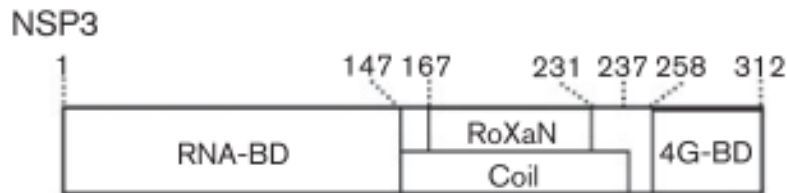
#### 4. Proteína no estructural NSP3

NSP3 es una proteína básica de 36.4 kDa codificada por el segmento 7 de la cepa de RV SA11, que forma homodímeros. Se propone que esta proteína facilita la traducción de los transcritos de mRNA viral y suprime la síntesis de proteínas del huésped a través de antagonizar la función de la proteína PABP <sup>25</sup>.

En el dímero de NSP3, las regiones N-terminales de los dos monómeros se entrelazan para formar un dominio de unión a RNA asimétrico que reconoce de manera específica la secuencia consenso GACC que se encuentra en el extremo 3' de todos los mRNAs de RV. En la región C-terminal los monómeros interactúan para formar una estructura alargada simétrica que contiene el dominio de unión para el factor de inicio de la traducción eIF4G (Figura 5). A través de su afinidad conjunta por GACC y eIF4G, se predice que el dímero de NSP3 podría promover la circularización del mRNA viral para facilitar su traducción <sup>37</sup>.

En la parte central de la proteína NSP3 se encuentra una región larga del tipo *coiled-coil* (aminoácidos 159-245), que se caracteriza por un patrón hepta- repetido (HPPHPPP)<sub>n</sub> con residuos hidrofóbicos (H) y polares (P). Además, en esta región se unen dos proteínas celulares: HSP90 y RoXaN (aminoácidos 225-258 y 167-237, respectivamente). La

interacción de HSP90 con NSP3 produce intermediarios de la dimerización y evita la degradación por el proteasoma. RoXaN es una proteína de unión al RNA, y aunque su función no se encuentra completamente descrita se sabe que es necesaria para la formación del complejo ternario eIF4G-NSP3-RoXaN, el cual parece ser importante en la relocalización de PABP-C al núcleo<sup>38</sup>.



**Figura 5.** Esquema de los dominios de NSP3. Los números corresponden a la posición de los aminoácidos, RNA-BD: dominio de unión a RNA, RoXaN: Dominio de unión a RoXaN, Coil: Hélice superenrollada (Coiled-Coil), 4G-BD: dominio de unión a eIF4G. Tomada de: M. M. Arnold, C. S. Brownback, Z. F. Taraporewala, and J. T. Patton, "Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein," *J. Gen. Virol.*, 2012.

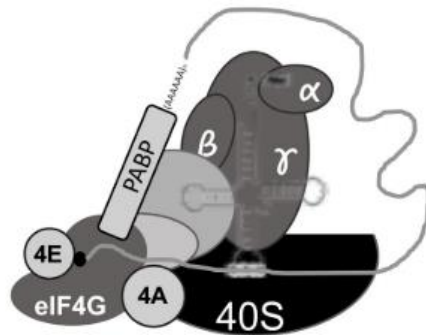
Se ha propuesto que la capacidad de NSP3 para competir con PABP por el sitio de unión a eIF4G inhibe la formación de complejos eIF4G-PABP necesarios para la traducción eficiente de los mRNA celulares poliadenilados, lo que podría apagar la traducción de proteínas celulares. Sin embargo, en diferentes estudios, llevados a cabo en cultivo celular, se ha cuestionado que esta función de NSP3 sea un requisito para la estimulación de la traducción de proteínas virales, esta información se amplía más adelante, en los antecedentes <sup>22</sup>.

## 5. Traducción de proteínas celulares

En células eucariotas, el inicio de la traducción de los mRNA incluye el reclutamiento de mRNA por el complejo eIF4F y el ensamblaje de las subunidades ribosomales 40S y 60S; Este proceso está mediado por los factores eucariotas de iniciación (eIFs). El complejo eIF4F está constituido por varios eIFs canónicos que juegan diferentes roles durante el inicio de la traducción; eIF4E, es la proteína de unión al cap, reconoce la estructura m<sup>7</sup>GpppG en el extremo 5' de los mRNA maduros; eIF4A es una RNA helicasa dependiente de ATP que desenrolla estructuras secundarias de los mRNA, eIF4G, funciona como una proteína de andamiaje en la que interactúan varios eIFs y la proteína PABP que se une al extremo 3' del mRNA poliadenilado. Este complejo promueve la interacción del mRNA con la subunidad ribosomal 40S (Figura 6) <sup>39</sup>. Una vez que la subunidad ribosomal 40S se une al mRNA, se escanea el mRNA en dirección 5'-3', hasta que se encuentra el primer codón AUG rodeado de secuencias consenso óptimas y se selecciona para iniciar la traducción. El contexto AUG mejor caracterizado para los mRNA de vertebrados es RCCAUGG (R para el nucleótido de purina), que se conoce mejor como la "secuencia de Kozak"<sup>22,40</sup>. La longitud de la región 5' UTR también es importante, ya que se requieren al menos 20 nucleótidos para reconocer eficientemente el codón AUG en un contexto sólido. Este requisito de longitud mínima probablemente sea el resultado de la protección estérica del ribosoma. Sin embargo, ciertas moléculas de mRNA se traducen por mecanismos diferentes al modelo convencional de inicio por escaneo. Los ejemplos bien caracterizados incluyen los sitios internos de entrada de ribosomas (IRES), TISU (iniciador de traducción de 5'UTR corto) o iniciación mediada por bucle de tallo de ciertos mRNA de histonas, entre otros <sup>22,41</sup>.

Durante el inicio de la traducción, se forma el complejo ternario (TC) compuesto por eIF2 $\alpha$ -GTP-Met-tRNA que es el encargado de introducir el Met-tRNA iniciador a la subunidad 40S unida al eIF4F y al mRNA, para comenzar el escaneo del mRNA. Una vez se encuentra el codón AUG, en el contexto adecuado, la subunidad ribosómica 60S se une para formar el complejo de iniciación 80S que inicia propiamente la síntesis de proteínas. Los eIFs se liberan con la ayuda de eIF5, lo que facilita la hidrólisis de GTP a GDP realizada por eIF2. El complejo binario formado por GDP-eIF2 es reciclado por eIF2B que intercambia GDP por GTP, y un nuevo tRNA-Met se carga para formar un nuevo complejo ternario, lo que resulta en nuevas rondas de iniciación <sup>40</sup>.

El intercambio de GDP por GTP en eIF2 es el paso limitante de la velocidad en la formación del complejo ternario, y está regulado por eIF2B. Los dos puntos de control principales para controlar el inicio de la traducción son la regulación de la actividad de eIF2 y la formación del complejo eIF4F. Interesantemente, estos puntos de control son los más afectados por diferentes virus durante los procesos infecciosos <sup>42</sup>.



**Figura 6:** Modelo de la interacción de mRNA para el inicio eficiente de su traducción. La circularización de los mRNA 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. Tomada de: H. I. Contreras-Treviño and L. Padilla-Noriega, "Regulación de la traducción mediada por la proteína NSP3 de rotavirus," *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, 2018.

### 5.1. Traducción de proteínas durante la infección por rotavirus

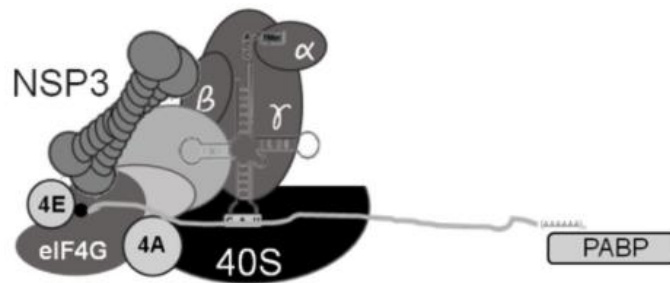
Durante a infección por RV el mRNA viral se sintetiza en el citoplasma, el cual debe traducirse para producir las proteínas virales que se requieren para formar nuevas partículas virales. Estos mRNA virales contienen una estructura cap metilada en el extremo 5' pero carecen de la cola de poly A característica del extremo 3' en la mayoría de los mRNA celulares; en cambio, los mRNA de rotavirus tienen una secuencia consenso (UGACC) en su extremo 3' que se conserva en todos segmentos del genoma viral <sup>43</sup>.

Se ha demostrado que la proteína NSP3 de RV se une a esta secuencia consenso de manera específica a través de su dominio N-terminal. NSP3 también se une a eIF4G a través de su dominio C-terminal, en la misma región utilizada por PABP pero con 10 veces mayor afinidad; por lo que se ha propuesto que durante la infección, NSP3



compite con PABP (que une los mRNA celulares) por el sitio de unión a eIF4G, lo que reduce la traducción de los mRNA celulares y al mismo tiempo se cree que mejora la traducción de los mRNA virales <sup>44</sup>. De modo que se ha propuesto que NSP3 inhibe la traducción de proteínas celulares al interactuar con eIF4G y prevenir la circularización de los extremos 5'-3' de los mRNA celulares mediada por eIF4E-eIF4G-PABP (Figura 6) necesaria para el ensamblaje eficiente de las subunidades ribosomales <sup>38</sup>.

En otros estudios se ha evidenciado que el desplazamiento de PABP de su sitio de unión por NSP3 (Figura 7), se correlaciona con la re-localización de PABP al núcleo. Normalmente esta proteína participa en la maduración y exportación nuclear de los mRNA celulares a través de la ruta CRM1. Sin embargo, no hace una contribución significativa a la exportación nuclear de mRNA. El mecanismo de importación de PABP al núcleo y el rol que esto pueda jugar en la infección por RV aún faltan por esclarecerse <sup>45</sup>.



**Figura 7.** Desplazamiento de PABP de su sitio de unión a eIF4G por NSP3.

Tomada de: H. I. Contreras-Treviño and L. Padilla-Noriega, "Regulación de la traducción mediada por la proteína NSP3 de rotavirus," *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, 2018.

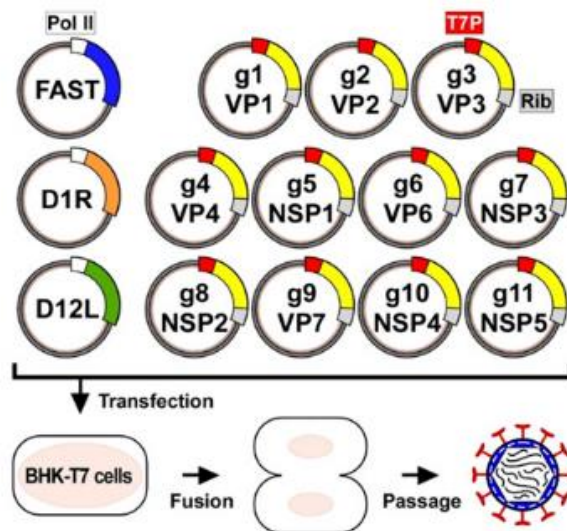
En las células infectadas por RV, la inhibición de la síntesis de proteínas celulares también está mediada por un segundo mecanismo, la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de eIF2 mediada por cinasas celulares de respuesta a estrés. Cuando se fosforila eIF2 $\alpha$ , se inhibe el intercambio de GDP a GTP catalizado por eIF2B, y el complejo eIF2-GDP se une con mayor afinidad a eIF2B evitando su activación. Esto, a su vez, reduce la formación del TC, provocando una reducción en la traducción global. El estado fosforilado permanente de eIF2 $\alpha$  es beneficioso para el virus, ya que en estas condiciones los mRNA virales se traducen eficientemente, mientras que la síntesis de la mayoría de las proteínas celulares se detiene. Sin embargo, los mecanismos por los cuales esto sucede, aún se desconocen <sup>46</sup>.

## 6. Sistema de genética reversa para rotavirus

Recientemente se desarrolló un sistema de genética reversa para RV basado en la transfección de plásmidos. En este sistema copias de cDNA correspondientes a cada uno de los 11 segmentos del genoma viral de la cepa de rotavirus de simio SA11 se clonaron en plásmidos en sitios flanqueados en el extremo 5' por la secuencia promotora de la polimerasa del fago T7 y en el extremo 3' por la ribozima antigenómica del virus de la hepatitis D (HDV). La transcripción de estos plásmidos usando la RNA polimerasa T7 y la autoescisión por la ribozima HDV genera transcritos de RNA con los extremos 5' y 3'

idénticos a los transcritos virales que son esenciales para la transcripción y la replicación de los segmentos virales.

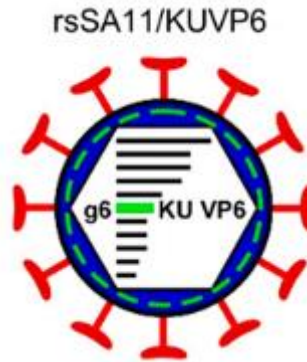
En este sistema, células BHK-T7 (que expresan establemente la RNA polimerasa T7) se co-transfectan con los 11 plásmidos correspondiente a cada uno de los segmentos de rotavirus, junto con un plásmido de expresión que codifica para la proteína FAST (que promueve la fusión entre células, lo que favorece la cotransfección de los plásmidos) y los plásmidos que codifican para las subunidades de la enzima de protección VV, la cual añade el cap eficientemente a los transcritos generados por la RNA polimerasa T7 en el citoplasma, D1R y D12L (Figura 8) <sup>47</sup>.



**Figura 8.** Sistema de genética inversa para RV. En este sistema se transfectaron en células BHK-T7 los plásmidos correspondientes a los 11 segmentos de RV junto con los plásmidos de expresión que codifican para FAST y la enzima de protección VV, la cual capea eficientemente las transcripciones de T7pol en el citoplasma y consta de dos subunidades, D1R y D12L. Tomada de: Y. Kanai et al., "Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2017

Con esta metodología es posible el obtener virus rearreglantes en los que se puede intercambiar un segmento de una cepa por el homólogo de otra cepa. Por ejemplo, se recuperó un virus monorrearreglante (rsSA11 / KUVP6), que contiene el segmento del gen de la cepa humana KU VP6 en el fondo genético de la cepa de simio SA11. El virus rearreglante exhibió una cinética de replicación similar a la del SA11 WT, aunque contenía el gen de KUVP6. La recuperación de virus monorrearreglantes demostró la utilidad del sistema de genética inversa, el cual permite además estudiar el papel de mutaciones específicas en un determinado segmento en el proceso de replicación viral (Figura 9) <sup>47,48</sup>





**Figura 9.** Monorrearreglante de rotavirus. Tomada de: Y. Kanai et al., "Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2017.

El sistema de genética reversa de RV sigue estudiándose y mejorándose. Recientemente se describió un sistema de genética reversa más simple para RVA, en el que solo se transfectan 11 plásmidos RVA-T7 en células BHK/ T7-9. En este sistema, se aumentaron las cantidades de los dos plásmidos de los genes NSP2 y NSP5; y esto mejoró la eficacia de recuperación de los RVA recombinantes. La eficiencia de recuperación fue aproximadamente 1,000 veces mayor que la del sistema que incluía el plásmido de expresión de la proteína FAST. Aunque el mecanismo subyacente al notable efecto de la sobreexpresión de las proteínas NSP2 y NSP5 sigue sin estar claro, se cree que está relacionado con la formación de viroplasmatas. Aprovechando este sistema optimizado, también se han generado con éxito RVA recombinantes que expresan reporteros bioluminiscentes (Nluc) y fluorescentes (EGFP y mCherry)<sup>48</sup>.

## 7. Estudio *in-silico* de proteínas

La estructura de la mioglobina fue la primera estructura tridimensional de una proteína que se determinó experimentalmente en 1958 mediante difracción de rayos X <sup>49</sup>. Sin embargo, los primeros hitos relacionados con la predicción de la estructura de proteínas fueron establecidos por Pauling y Corey en 1951 con la publicación de dos artículos sobre la predicción de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  <sup>50</sup>. Gracias a estos primeros avances, en la actualidad es posible utilizar computadoras para realizar cálculos que permiten predecir, con diversos grados de certeza, la estructura secundaria y terciaria (especialmente gracias a los algoritmos de reconocimiento de pliegues también llamados threading) de proteínas <sup>51</sup>.

Si bien determinar la estructura de una proteína es clave para entender su función, es importante resaltar que las interacciones de dicha proteína con las diversas moléculas en el interior celular también son una parte fundamental para su función. Entre estas se encuentran las interacciones proteína-proteína (PPI); las cuales son cruciales para la formación de estructuras macromoleculares y complejos enzimáticos que son intrínsecos a casi todos los procesos celulares. Por lo tanto, las PPI son esenciales para la homeostasis celular y su desregulación generalmente conduce a disfunción celular. Debido a que los métodos experimentales para determinar dichas interacciones son costosos, lentos, y laboriosos; también se han desarrollado una variedad de herramientas bioinformáticas que

permiten realizar predicciones confiables, las cuales actualmente ahorran tiempo y recursos <sup>52</sup>.

## 7.1. Modelado de proteínas

La función de una proteína está determinada por su secuencia y su estructura tridimensional(3D). Los proyectos de secuenciación del genoma a gran escala proporcionan millones de secuencias de proteínas, a un ritmo sin precedentes. Sin embargo, la tasa de caracterización estructural experimental de estas secuencias está limitada por el costo, el tiempo y los desafíos experimentales inherentes a la determinación estructural por cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)<sup>53</sup>.

El modelado de proteínas por comparación de estructuras (homología) se ha utilizado para producir modelos de estructura fiables de al menos un dominio en más de la mitad de todas las secuencias conocidas. Por lo tanto, los modelos *in-silico* pueden brindar información estructural para dos órdenes de magnitud más de secuencias que los métodos experimentales, y se espera que se confíe cada vez más en ellos a medida que la brecha entre el número de secuencias conocidas y el número de estructuras determinadas experimentalmente continúa ampliándose <sup>54</sup>.

El modelado comparativo consta de cuatro pasos principales <sup>55</sup>: (1) Identificar la similitud general entre el objetivo y al menos una estructura molde conocida; (2) alinear de la secuencia objetivo y lo(s) moldes(s); (3) construir un modelo basado en el alineamiento con los moldes elegidos; y (4) evaluar la precisión del modelo.

Una estrategia de validación de los modelos obtenidos por homología, es la utilización de los diagramas de Ramachandran<sup>56</sup>, ya que en ellos se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diedros  $\psi$  (psi) contra  $\phi$  (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas. Según el servidor PROCHECK, un modelo de buena calidad es aquel que tiene más del 90% de sus residuos ubicados en su región más favorable en el diagrama de Ramachandran. La utilización de esta herramienta permite, por lo tanto, aproximar de manera temprana y confiable la estructura secundaria del péptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura, tales como las  $\alpha$  hélice y las hojas  $\beta$  <sup>57</sup>.

## 7.2. Docking molecular

El docking o acoplamiento molecular es una herramienta bioinformática que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco a partir de sus estructuras tridimensionales. El acoplamiento molecular comúnmente emplea dos algoritmos por separado. Un primer algoritmo de muestreo que predice todas las configuraciones y conformaciones estructurales que el ligando puede asumir dentro de un dominio o sitio activo en el blanco proteico, y un segundo algoritmo con una función de puntuación que determina las energías de unión

entre el ligando y el receptor para cada una de las configuraciones establecidas por el primer algoritmo. Luego, en base al funcionamiento de estos dos algoritmos, todas las configuraciones de unión del ligando y su receptor son clasificadas (o jerarquizadas) de acuerdo con sus energías de unión. Por tanto, las funciones de puntuación son capaces de filtrar compuestos a partir de grandes bases de datos en una búsqueda virtual, donde la configuración de un compuesto con el más alto puntaje debería corresponder a la configuración con una energía de unión más favorable <sup>58,59</sup>.

Sin embargo, el acoplamiento molecular mediante HDOCK tiene algunas debilidades; una de ellas es que no toma en cuenta la naturaleza dinámica del blanco proteico considerándolo erróneamente como una estructura estática. Además, existen algunas limitaciones en los algoritmos de muestreo e imperfecciones en las funciones de puntaje que dan lugar en algunos casos, a la generación de falsos positivos y negativos haciendo que la precisión sea muy dependiente del blanco proteico. Por esta razón, no se debe subestimar la importancia de complementar los hallazgos *in-silico* con métodos experimentales <sup>59-61</sup>.

### 7.3. Softwares y servidores

Los experimentos de docking molecular presentados en este trabajo se llevaron a cabo en el servidor HDOCK; el cual incorpora automáticamente la información de la interfaz de enlace de Protein Data Bank (PDB) y / o información biológica señalada por el usuario como restricciones de residuos e información de tamaño / forma molecular obtenida por dispersión de rayos X, admite tanto la secuencia de aminoácidos como los enlaces de estructura y utiliza una función de puntuación intrínseca para las interacciones proteína-proteína. Además, el servidor también permite el acoplamiento de proteínas con RNA/DNA. HODCK es fácil de usar y ha procesado más de 30.000 trabajos de acoplamiento en todo el mundo desde su primer lanzamiento en 2017. Recientemente, HDOCK fue calificado como el servidor de acoplamiento número uno para la predicción de estructuras de proteínas multiméricas <sup>62</sup>.

Si bien la energía de unión obtenida del servidor HDOCK es un dato útil y confiable, cuando se quiere analizar más a fondo la naturaleza de la unión entre el ligando y la proteína se requieren de otros softwares; el más utilizado desde su desarrollo en 1995 es LIGPLOT <sup>63</sup>. El algoritmo LIGPLOT primero toma la estructura 3-D del ligando y la 'desenrolla', aplanándola en formato 2-D. Al hacerlo, lleva consigo las cadenas laterales unidas por puentes de hidrógeno y las cadenas laterales involucradas mediante interacciones hidrofóbicas, aplanándolas también y colocándolas de modo que la superposición de átomos y el cruce de enlaces en el diagrama final se mantengan al mínimo. Sin embargo, la estructura en esta etapa probablemente incluirá una gran superposición entre átomos y enlaces, lo que resultará en un diagrama muy congestionado y confuso de las interacciones. Por tal razón, se sigue a un paso de "limpieza", donde se realizan diferentes rotaciones de 180° a lo largo de la estructura para encontrar la conformación con menor número de superposiciones. Una vez limpia la representación en 2-D, se traza el diagrama de la estructura.

Es claro que este procedimiento introducirá algunas distorsiones en la estructura, como es inevitable al convertir un objeto 3-D en una representación 2-D. Por ejemplo, todos los ángulos de torsión, siendo completamente planos, serán 0 o 180 °. A pesar de que estos efectos secundarios son inevitables en cualquier intento de presentar estructuras en 2-D, no restan valor a la información de los diagramas.

Más recientemente se lanzó LigPlot +, una reelaboración completa del LIGPLOT original que permite la representación 2D de múltiples complejos ligando-proteína de una manera simple y automatizada. Los diagramas se pueden editar manualmente en cualquier etapa del proceso; este software puede usarse para modelos estructurales determinados experimentalmente, modelos de homología o resultados de acoplamiento <sup>64</sup>.

## Antecedentes

Se sabe que el dominio N-terminal de NSP3 se une con alta afinidad y especificidad a la secuencia consenso UGACC del extremo 3' de los mRNA virales, y el dominio C-terminal de NSP3 se une al factor de inicio de la traducción eIF4G, desplazando a la PABP de este sitio de unión. A partir de estas interacciones se ha propuesto que NSP3 funciona como un potenciador traduccional para los mensajeros virales, que facilita su circularización en torno a los complejos de inicio de la traducción, promoviendo así su expresión. Adicionalmente, se ha reportado que NSP3 participa en el silenciamiento de la expresión de las proteínas celulares, mediante la relocalización de PABP al núcleo.

Se ha reportado que la sobre-expresión de NSP3 en células en cultivo disminuye el nivel de síntesis de proteínas celulares<sup>65</sup>. Sin embargo, el papel de NSP3 como potenciador traduccional de los mensajeros virales no se ha establecido con certeza, ya que a pesar de que las interacciones de NSP3 con eIF4G y el extremo 3' de los mRNA virales se han establecido claramente, no hay evidencia directa de que NSP3 participe simultáneamente en estas dos interacciones para promover la circularización de los mRNA virales, y aunque generalmente se acepta, tampoco hay evidencia de que estas interacciones favorezcan su traducción.

En nuestro laboratorio se ha estudiado el papel de NSP3 en la traducción de proteínas virales y celulares, y se ha encontrado que la síntesis de proteínas virales no se ve afectada al silenciar la expresión de NSP3 en células infectadas por RV, lo que sugiere que la unión de esta proteína al extremo 3' de los mRNA virales no es necesaria para su traducción. Sin embargo, no es posible descartar la posibilidad de que una muy baja expresión de NSP3 (no detectable en los ensayos de western blot) sea suficiente para permitir la síntesis de proteínas virales. Por otra parte, se ha encontrado que en células infectadas con RV en las que se silencia la expresión de NSP3, se detectan niveles más altos de RNA viral (tanto mRNA como dsRNA), y un aumento en la producción de virus infecciosos, resultado que no ha sido fácil de explicar<sup>66</sup>.

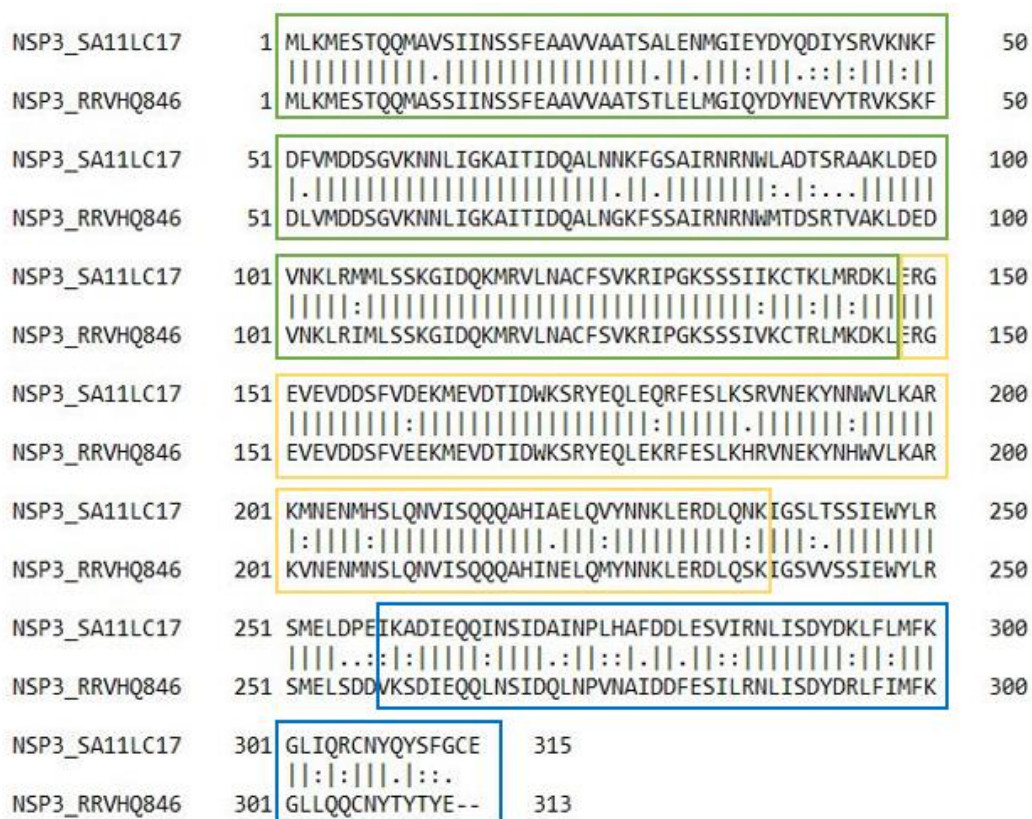
Adicionalmente, en nuestro laboratorio se encontró que la expresión de genes reporteros transfectados en células MA104 es mucho mayor en células infectadas por RV que en células no infectadas; en este ensayo también se demostró que en las células infectadas la eficiencia traduccional de los reporteros no estaba determinada por sus UTR's, ya que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los reporteros que contenían UTR's de elementos virales, con respecto a la expresión de los que contenían UTR's de elementos celulares. Asimismo, se determinó que el apagado de la síntesis de las proteínas celulares durante la infección por RV, se debe directa o indirectamente a la presencia de NSP3 y corresponde a un bloqueo del transporte núcleo-citoplasma, que llevaba a la acumulación de los mRNA celulares en el núcleo<sup>67</sup>.

Por otro lado, Arnold y colaboradores, estudiaron un virus rearreglante que expresa una NSP3 duplicada, la cual contiene dos dominios de unión a RNA, un solo dominio de unión al factor eIF4G, y pesa casi el doble que la NSP3 silvestre. En su estudio encontraron que el virus rearreglante tenía una curva de crecimiento similar a la del silvestre, pero no relocalizaba PABP al núcleo y tenía una capacidad deficiente para interferir con la traducción de los RNA poliadenilados. Además, ensayos de co-inmunoprecipitación indican que en comparación con la NSP3 silvestre, la NSP3 duplicada tiene una capacidad disminuida para interactuar con el factor eIF4G<sup>37</sup>. En conjunto este trabajo sugiere que una capacidad defectuosa de unión al factor

eIF4G y de apagado de la traducción de mensajeros poliadenilados, no afecta dramáticamente el crecimiento viral.

Para esclarecer el efecto de NSP3 durante el ciclo replicativo viral, se propone un estudio donde se construyan NSP3 mutantes, con cambios en sus sitios de interacción más importantes, para ser utilizadas en el sistema de genética reversa de RV, generando virus rearreglantes que expresen diferentes NSP3, lo que permitiría esclarecer la función de las interacciones de esta proteína con el RNA viral y la maquina traduccional celular.

En nuestro laboratorio, RRV es la cepa de RV sobre la cual se ha estudiado la función de la proteína NSP3; sin embargo, el sistema de genética reversa implementado actualmente solo recupera cepas SA11 de RV con eficiencia. Por esta razón, se generó un virus rearreglante que presenta el segmento 7 del genoma de RRV que codifica para la proteína NSP3, junto con la secuencia de la proteína reportera GFP, en el fondo genético del virus SA11. Debido a diferencias importantes encontradas en las secuencias de ambas proteínas NSP3 (Figura 10, Tabla 2), se espera inicialmente caracterizar el virus rearreglante con respecto a las cepas parentales RRV y SA11, para usarlo como control en futuros ensayos.



**Figura 10.** Alineamiento de secuencias de la proteína NSP3 codificada por SA11 y RRV. NSP3\_SA11LC17: NSP3 codificada por SA11, NSP3\_RRVHQ846: NSP3 codificada por RRV. Verde: Dominio N-terminal. Amarillo: región Coil-coiled. Azul: Dominio C-terminal. Los cambios de aminoácidos representados con ":" son cambios conservados, los cambios señalados con "." son cambios no conservados.

**Tabla 2.** Análisis del alineamiento de secuencias de las proteínas NSP3 de RRV y SA11.

<i>Proteínas</i>	<i>% de identidad</i>	<i>% de cambios en dominio C-terminal</i>	<i>% de cambios en dominio N-terminal</i>	<i>% de cambios en dominio de dimerización</i>
<i>NSP3 de RRV</i> <i>Código de acceso:</i> <i>GenBank:</i> <i>AEK32842.1</i>	82.43	40	46.66	13.33
<i>NSP3 de SA11</i> <i>Código de acceso:</i> <i>GenBank:</i> <i>BAW94619.1</i>				

## Hipótesis

La interacción de NSP3 con el factor eIF4G no afecta la traducción de proteínas virales, pero si interfiere con la traducción de proteínas celulares. Mientras que la interacción de NSP3 con el extremo 3' del mRNA viral no afecta la traducción de proteínas virales ni celulares, durante la infección por rotavirus.

## Objetivos

### 1. Objetivo general

Evaluar el papel de los diferentes dominios de interacción de la proteína NSP3 sobre la traducción de proteínas celulares y virales durante la infección por rotavirus.

### 2. Objetivos Particulares

- 2.1. Caracterizar el RV rearreglante obtenido por genética reversa, que expresa la proteína NSP3 de RRV y la proteína GFP, en el fondo genético de SA11.
- 2.2. Identificar mediante docking molecular sitios de interacción de NSP3 que participan en el control de la traducción de proteínas celulares y virales.



# Materiales y métodos

## Células y virus

Se utilizó la línea celular MA104 (epitelial de mono verde), la cual fue cultivada en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) Advance con 5% de suero fetal bovino (SFB). Las cepas de RV que se utilizaron en este trabajo fueron: la cepa de rotavirus de simio (SA11), la cepa de simio Rhesus (RRV), y el rearreglante SA11/RRVNSP3, que comprende el fondo genético de SA11 con el segmento 7 de RRV que codifica para la proteína NSP3, junto con la proteína reportera GFP.

## Plásmidos

Se construyeron tres plásmidos (Figura 11) utilizando un protocolo de PCR, seguido de una ligación de los extremos fosforilados del producto de PCR. El plásmido que se usó como molde en las 2 primeras construcciones codifica para la proteína NSP3 de RRV y para la proteína fluorescente GFP. Este plásmido contiene el promotor T7 y la ribozima de HDV en extremo 3'. En la primera construcción se usaron los oligos PVUII Rev y Oligo T2A-GFP FW (Tabla 3) generando un plásmido que expresa una proteína NSP3 con delección en el dominio de unión a eIF4G y la proteína reportera GFP (construcción NSP3 RRV Δ4G). Para el segundo plásmido se usaron los oligos NSP3 Reverse y Oligo MfeFW (Tabla 3) que generaron un plásmido que expresa una proteína NSP3 con delección en el dominio de unión a RNA y la proteína reportera GFP (construcción NSP3 RRV ΔRBD).

Para generar el tercer plásmido, se usó como molde la construcción NSP3 RRV Δ4G, y los oligos NSP3 Reverse y Oligo MfeFW, lo que generó un producto de PCR que después de ser fosforilado y ligado, conforma un plásmido que expresa una proteína NSP3 con delección en ambos dominios de interacción N-terminal y C-terminal, y la proteína reportera GFP (construcción NSP3 RRV DD). Finalmente, todos los plásmidos fueron amplificados en bacterias *E. coli* cepa JM101 y confirmados por secuenciación.



**Figura 11.** Plásmidos de NSP3 mutantes en sus dominios de interacción. Los números corresponden al número de pb en el marco de lectura de la proteína NSP3. HDV Rz: Ribozima del virus de la hepatitis D. Flechas rojas: Oligos empleados en las PCRs

**Tabla 3.** Secuencias de los oligos empleados en la construcción de mutantes

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
PVUII Rev	5' AGCTGTTGTTCAATGTCTGATTTTAC 3'
T2A GFP FW	5' CTCCCGTCTCCTTCAGACGATTGTACGCC 3'
NSP3 Reverse	5' TACACCAGAATCATCCATAACTAAATC 3'
Mfe FW	5' TACCTTCATCTATGTTAACTAACC 3'

## Infeción

Las células MA104 se cultivaron en medio MEM – Advance con 5% de SFB a 37°C en una atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente se lavaron con MEM sin suero 2 veces. A continuación, las células se infectaron con la cepa del virus RV correspondiente (previamente tratada con tripsina a una concentración de 100µg/mL a 37°C por 30 minutos) en MEM sin suero a la MOI indicada según cada caso. Para la adsorción, el virus se dejó incubando 1hr a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. En seguida, las células se lavaron con MEM sin suero y se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, las células fueron cosechadas según el tiempo de infección indicado en cada experimento.

## Obtención de lisados virales con títulos altos

Para aumentar los títulos virales se realizaron infecciones repetidas aumentando la cantidad de células en cada ronda de infección. Para los lisados de RRV y SA11 se partió de una MOI inicial baja (0.1), se dejó 1 hora de adsorción, y posteriormente se incubó con tripsina a una concentración de 50µg/mL durante aproximadamente 3 días. Para el virus rearreglante SA11/RRVNSP3 recién recuperado del sistema de genética reversa, se usó una MOI inicial de 0.5, se dejó 2 horas de adsorción, y se incubó con tripsina a una concentración de 50µg/mL durante aproximadamente 5 días. Posterior al tiempo de incubación, las células infectadas se congelaron y descongelaron 2 veces, se rasparon y colectaron en tubos cónicos estériles, y se centrifugaron 2000 RPM por 5 min. Finalmente, el lisado fue sonicado en hielo hasta que desapareció el pellet, alicuotado y conservado a -70°C hasta su uso.

## Electroferotipo

Se extrajo RNA de los lisados virales, obtenidos por el procedimiento descrito anteriormente, usando TRIzol. El RNA extraído se corrió en un gel de poliacrilamida al 10%. A continuación, se fijó dejándolo en agitación suave durante 30 min en la solución fijadora 1X. Luego, se tiñó con nitrato de plata en agitación suave durante 30 min. Finalmente, se agregó la solución reveladora, hasta obtener la señal deseada. Una vez que se observaron las bandas con respondientes a los RNAs de RV, se paró la reacción usando una solución stop.

**Tabla 4.** Composición de las soluciones empleadas en la realización del electroferotipo

<b>Cantidad</b>	<b>Reactivo</b>
<b>Gel para electroforesis</b>	
9 mL	Agua destilada
3.8 mL	Tris pH 8.8 2M

6.6 mL	Acrilamida-Bis 3.0-0.8 %
250 µL	Persulfato de amonio 10%
6 µL	TEMED
<b><i>Solución fijadora 10X</i></b>	
287 mL	Etanol
3 mL	Ácido acético
<b><i>Nitrato de plata</i></b>	
1 mL	Nitrato de plata 100X
100 mL	Agua destilada
<b><i>Solución reveladora</i></b>	
7 mL	NaOH 10 M
0.8 mL	Formaldehido 38%
92.2 mL	Agua destilada
<b><i>Solución stop</i></b>	
120 mL	Ácido acético 10 %

### Ensayo de progenie viral

Se infectaron monocapas de células MA104 crecidas a confluencia en una placa de 48 pozos, a una MOI de 1, como se describió anteriormente, en intervalos de 3 horas, durante 15 horas. Se incubaron a 37°C, en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, y se cosechó el contenido de los pozos usando 100µL de buffer de lisis (Tabla 5), el lisado celular obtenido se pasó a tubos estériles y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos para retirar núcleos y restos celulares. Los sobrenadantes se utilizaron para infectar una nueva placa de células MA104 de 96 pozos, donde se determinó el título viral mediante un ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa.

**Tabla 5.** Composición del Buffer de lisis

Reactivo	Concentración
Tritón	0.1%
NaCl	150 mM
Buffer Tris pH 8	50 mM

### Determinación de título viral por formación de focos por inmunoperoxidasa

A las células MA104 previamente infectadas se les retiró el medio MEM a las 16 horas post-infección (hpi) y se fijaron con acetona al 80% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el anticuerpo  $\alpha$ -TLPs a una dilución de 1:2000 durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se agregó proteína A conjugada con peroxidasa a una dilución de 1:3000 durante 1 h a 37 °C. Una vez concluido el tiempo, se realizó un lavado con PBS y se agregó el sustrato carbazol. El número de focos se contó en un microscopio de campo claro utilizando el objetivo de 20X.

### Marcaje radiactivo de proteínas

Las células MA104 cultivadas en placas de 48 pozos se infectaron con la cepa de RV correspondiente según el experimento. A las 6.5 hpi, el medio fue reemplazado por MEM sin

metionina, suplementado con 0.01 % de glutamina 100X. Después de 30 min, a las 7 hpi, el medio se reemplazó por MEM sin metionina suplementado con 40  $\mu$ Ci / ml de mezcla de etiquetado Easy-tag Express- [<sup>35</sup>S] y se incubó durante 1 hora. A las 8 hpi, las células se lisaron con buffer de muestra Laemmli (Tabla 6). Posteriormente, las muestras se hirvieron por 5 min y se trataron por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), ajustando la cantidad de proteína cargada en cada carril mediante tinción con azul de Coomassie. La incorporación de la marca radioactiva se reveló mediante autoradiografía.

**Tabla 6.** Composición del Buffer Laemmli

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH6.8	50 mM
SDS	2%
Azul de Bromofenol	0.1%
Glicerol	10%
B-Mercaptoetanol	5%

## Western Blot

Las células MA104 cultivadas en placas de 48 pozos se infectaron con la cepa de RV correspondiente según el experimento, como se describió anteriormente. A las 8 hpi se lisaron con buffer de muestra Laemmli. Posteriormente, se hirvieron por 5 min y se analizaron por electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se electrotransfirieron del gel a una membrana de Inmobilon (Milipore) utilizando una cámara húmeda por 60 min a 130 mA, con buffer CAPS (CAPS, Metanol 10%). A continuación, la membrana se bloqueó por 1h a temperatura ambiente en agitación con 5% de leche descremada en PBS-Tween 0.1%. La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:3000, en una solución con 1% de leche descremada en PBS-Tween 0.1%, en agitación suave durante 1h a temperatura ambiente. Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces por 10 min con PBS-Tween 0.1%. Luego, se añadió el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en una dilución 1:3000 y se incubó por 1h a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se lavó la membrana 3 veces por 10 min con PBS-Tween 0.1%, y se detectaron las proteínas usando el sistema de Western Lightning. Los resultados se cuantificaron por densitometría de imagen usando el programa ImageJ. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphad prism 8.

## Formación de placas

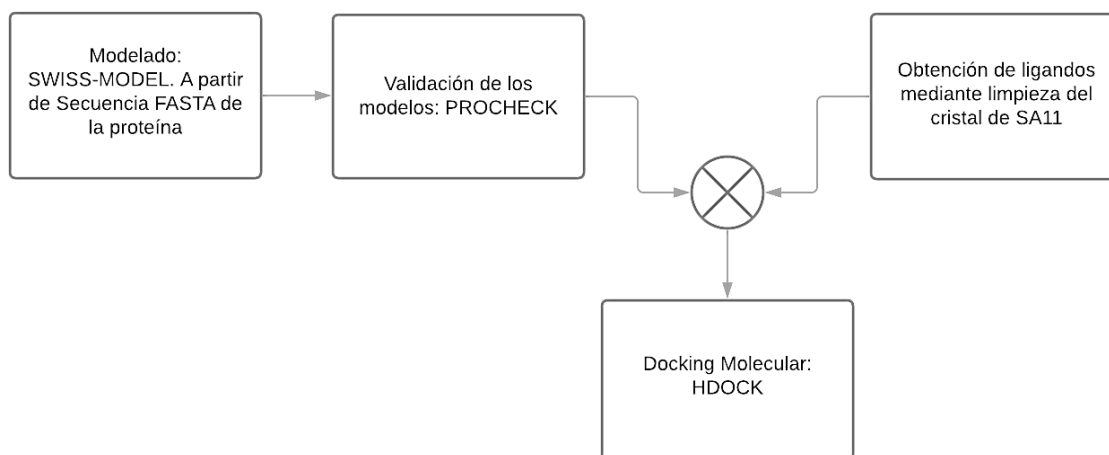
Las células MA104 se cultivaron en medio MEM – Advance con 5% de SFB a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar la confluencia en una placa de 6 pozos. Posteriormente se lavaron con MEM sin suero 2 veces. A continuación, las células se infectaron con la cepa del virus RV correspondiente (previamente tratada con tripsina a una concentración de 100 $\mu$ g/mL a 37°C por 30 minutos) en MEM sin suero haciendo diluciones seriadas. Para la absorción, el virus se dejó incubando 1hr a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. En seguida, las células se lavaron con MEM sin suero, se agregó una capa de agar suave (3 mL por pozo) preparado en MEM sin suero a pH7 (agarosa 0.6%, glutamina 100X 0.01%, tripsina 1% 3 $\mu$ g/mL) y se dejó solidificar en reposo. Posteriormente, las células se dejaron incubando durante 48-72hr a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La presencia de placas se reveló usando 500  $\mu$ L de una tinción de rojo neutro al 1% en una dilución 1:30 en MEM sin suero en cada pozo y se incubaron en la oscuridad 2hr a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Posterior al tiempo de incubación, se observaron las placas a contraluz, se fotografiaron y el tamaño se midió usando ImageJ. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphad prism 8.

### Evaluación *in-silico* de mutantes de NSP3

Para evaluar las mutantes de NSP3 de la cepa RRV se construyeron los modelos de sus dominios N-terminal y C-Terminal, mediante modelado por homología, tomando como templatado los cristales reportados para estos dominios de la proteína NSP3 de SA11. Cada uno de los modelos obtenidos fue validado mediante diagramas de Ramachandran. Los modelos se construyeron usando el servidor SWISS-MODEL, y se validaron usando el servidor PROCHECK.

En los ensayos de docking molecular se emplearon los modelos de NSP3 obtenidos como se describió anteriormente, y como ligando se utilizó la región del factor eIF4G que interacciona con NSP3, o la secuencia consenso del RNA viral (GACC) según el experimento. En estos ensayos se realizaron en el servidor HDOCK, y se usó como control un modelo de NSP3 silvestre de RRV, cuya energía de unión a cada uno de los ligandos se comparó con las energías obtenidas en las mutantes.



**Figura 12.** Proceso para la evaluación *in-silico* de mutantes de NSP3.

### Análisis estadístico

Todos los experimentos reportados en esta tesis cuentan con 3 réplicas biológicas independientes, excepto el ensayo de formación de placas (Figura 17) que cuenta con 1 sola replica y, por lo tanto, se presenta como resultado preliminar. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphad prism 8, y se aplicaron diferentes pruebas estadísticas en cada experimento según los grupos analizados y la distribución de los datos, como se reporta en cada apartado de los resultados.

## Resultados

### Obtención de lisados virales con títulos altos

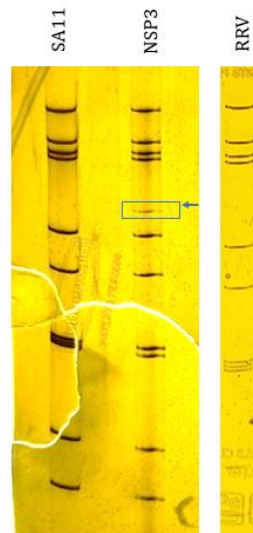
Para realizar experimentos a MOI 5 es necesario obtener lisados virales con títulos altos. En el laboratorio ya se contaba con el virus rearreglante SA11/RRVNSP3 recién recuperado del sistema de genética reversa, este virus fue recuperado por el M. en C. Marco Antonio Espinoza, el Dr. Carlos Sandoval-Jaime y la Dra. Susana López (resultados no publicados). Este virus no produjo títulos altos siguiendo el procedimiento estándar. Sin embargo, con las modificaciones mencionadas en materiales y métodos, después de varias rondas de infección, se lograron obtener títulos altos con los tres virus (Tabla 7).

**Tabla 7.** Títulos virales

Virus	Titulo
RRV	1.5X10 <sup>7</sup> UFF/mL
SA11	2.6X10 <sup>7</sup> UFF/mL
SA11/RRVNSP3	2.6X10 <sup>7</sup> UFF/mL

### Electroferotipo

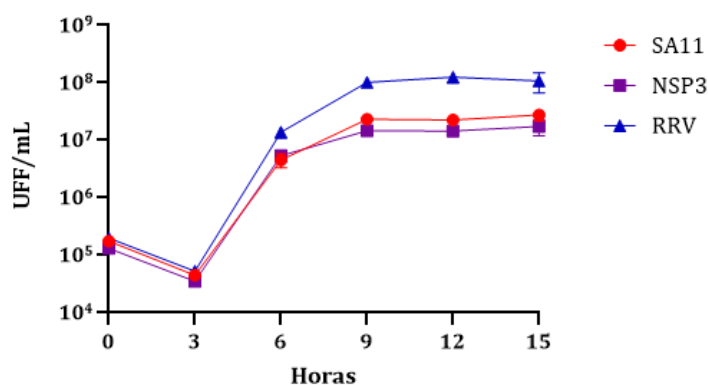
Debido a la manipulación de los lisados virales, a fin de producir títulos altos, se decidió comprobar la pureza de estos lisados antes de empezar a trabajar con ellos. Para esto, se realizó un ensayo de electroforesis (electroferotipo) con los lisados, y en caso de estar contaminados con virus silvestre se partió de un lisado stock, se volvió a aumentar el título viral, y se volvió a comprobar su pureza, antes de usarlos en algún experimento. En la Figura 13 se observa que todos los lisados se encuentran debidamente purificados; en el caso del virus rearreglante (NSP3) se evidencia la presencia de una banda de mayor tamaño que corresponde al segmento 7 del virus con la secuencia de la proteína GFP adicionada.



**Figura 13.** Electroferotipo de lisados virales. NSP3: Electroferotipo del virus rearreglante SA11/RRVNSP3. La flecha azul señala la presencia del segmento 7 que codifica para la proteína NSP3 de RRV y la proteína GFP.

## Ensayo de progenie viral

Para determinar si había alguna diferencia en el crecimiento entre el rearreglante y los virus parentales se realizó una cinética de infección de 15 horas. Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon, y se encontró que no hay diferencias significativas (valor  $P=0.15$ ) entre el crecimiento del virus rearreglante y SA11; pero si hay una diferencia significativa entre el crecimiento de RRV y el virus rearreglante (valor  $P=0.03$ ) (Figura 14). Es decir, SA11/RRVNSP3 es similar en su crecimiento a SA11, el virus que aporta su fondo genético.



**Figura 14.** SA11/RRVNSP3 es similar en su crecimiento a SA11, el virus que aporta su fondo genético.

## Marcaje radiactivo de proteínas

Con el objetivo de caracterizar el rearreglante SA11/RRVNSP3, se realizó un ensayo de marcaje radioactivo de proteínas con los tres virus (RRV, SA11, y SA11/RRVNSP3). Para este ensayo se usó una MOI de 5 (Figura 15) con cada uno de los virus, y se midió la síntesis de proteínas *de novo* a 8 hpi, como se describió anteriormente. En este ensayo los pozos Mock fueron tratados de la misma manera que los pozos SA11, RRV y NSP3, con la diferencia de que no fueron infectados, estos pozos se usaron como control para observar el patrón de síntesis de proteínas celulares en ausencia de infección. En los 3 pozos infectados se puede observar que disminuye la intensidad del patrón de proteínas celulares con respecto al pozo Mock, mientras que las bandas que corresponden a las proteínas virales de los tres virus se observan con intensidad equivalente. La disminución en la intensidad de la señal radioactiva en las bandas que corresponden a las proteínas celulares significa que, en las células infectadas, a las 8 hpi durante la hora de marcaje radiactivo, la tasa de síntesis *de novo* de estas proteínas disminuyó.

En este experimento no se observaron cambios significativos entre los 3 virus. De modo que en cuanto a la síntesis de proteínas virales y al fenotipo de apagado de síntesis de proteínas celulares, el virus rearreglante SA11/NSP3RRV es semejante a los dos virus parentales.

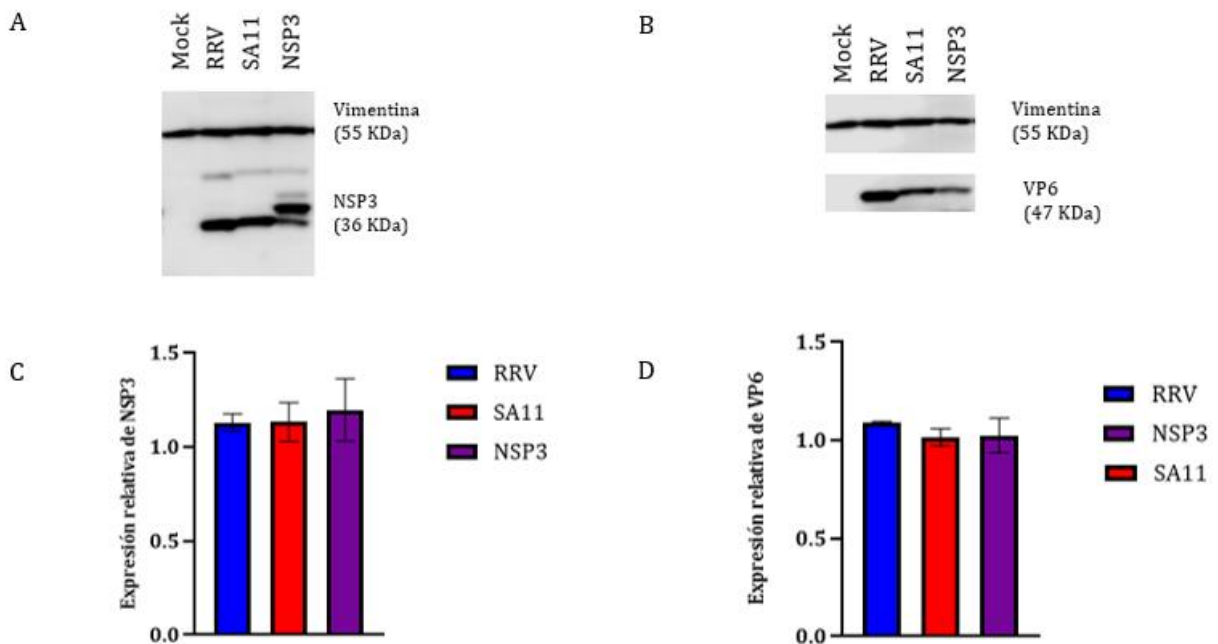


**Figura 15.** SA11/RRVNSP3 no difiere de los virus parentales en cuanto al fenotipo de apagado de la síntesis de proteínas celulares. Mock: células mock infected. RRV, SA11, NSP3: células infectadas con cada uno de los virus. NSP3: Virus rearreglante SA11/NSP3RRV.

### Expresión de proteínas virales

Para detectar diferencias en la expresión de proteínas virales, y especialmente en la expresión de NSP3 entre los tres virus, se realizó un Western Blot donde se usó como control de carga la proteína celular vimentina. Los resultados obtenidos por densitometría se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y se encontró que no hay diferencias significativas en la expresión de NSP3 entre los 3 virus (valor  $P=0.9$ ); sin embargo, hay una ligera variación en la migración de la proteína NSP3 codificada por el virus rearreglante. Esta diferencia en el peso molecular se debe a la presencia del elemento T2A en el plásmido de expresión. El elemento T2A es una secuencia de salto ribosomal, que permite que se traduzca la proteína reportera GFP separada de la proteína NSP3; este elemento añade aproximadamente 9 aminoácidos a la proteína de NSP3, lo que aumenta su peso molecular y cambia su patrón de migración. De igual manera, se analizó la expresión de la proteína estructural VP6, y tampoco se evidenció una diferencia significativa en su expresión entre los 3 virus (valor  $P=0.5$ ). En el caso de la NSP3 codificada por el virus rearreglante se observan 2 bandas, esto puede ser debido al uso un anticuerpo policlonal que reconoce inespecíficamente otra proteína viral (VP7) que se encuentra en un peso molecular similar (37 KDa), o puede haberse presentado un nivel bajo de contaminación con NSP3 silvestre no detectable en el electroferotipo. Sin embargo, el electroferotipo, la abundante presencia de la NSP3 modificada en el Western Blot e imágenes de inmunofluorescencia donde se observa abundante presencia de GFP, confirman la presencia mayoritaria del virus SA11/NSP3RRV (Figura 16).





**Figura 16.** SA11/RRVNSP3 no difiere de sus virus parentales en cuanto a la expresión de proteínas virales. (A) Western Blot de lisados celulares 8 hpi usando un anticuerpo policlonal contra NSP3. (B) Western Blot de lisados celulares 8 hpi usando un anticuerpo policlonal contra proteínas estructurales. (C) Cuantificación de la expresión de NSP3 en los lisados virales. Azul: RRV, Rojo: SA11, Morado: SA11/RRVNSP3. Las barras señalan el error estándar en las mediciones. No se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de NSP3 (valor  $P=0.9$ ). (D) Cuantificación de la expresión de VP6 en los lisados virales. Azul: RRV, Rojo: SA11, Morado: SA11/RRVNSP3. Las barras señalan el error estándar en las mediciones. No se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de VP6 (valor  $P=0.5$ ).

## Formación de placas

Para continuar con la caracterización de los 3 virus (RRV, SA11, SA11/RRVNSP3) se realizó un ensayo de formación de placas, utilizando diluciones seriadas de cada uno de los virus y comparando el tamaño de las placas. En este ensayo se encontró que RRV forma las placas más pequeñas y SA11 forma las placas más grandes. Al aplicar un análisis Nested-t se encontró que no hay diferencias significativas entre el tamaño de las placas formadas por SA11 y el tamaño de las placas formadas por el virus rearreglante (valor  $P=0.059$ ), pero si una diferencia significativa entre el tamaño de las placas formadas por RRV y el tamaño de las placas formadas por SA11/RRVNSP3, con un valor de  $P$  igual al 0.0027 (Figura 17). Adicionalmente, es necesario mencionar, que este es un resultado preliminar, ya que se requieren 2 réplicas más para obtener un resultado estadísticamente significativo.



**Figura 17.** SA11/RRVNSP3 genera un fenotipo de placa similar a SA11, el virus que aporta su fondo genético. (A) Placas formadas por RRV, SA11 y SA11/NSP3RRV. (B) Representación Gráfica de los tamaños de placa formados por cada virus.

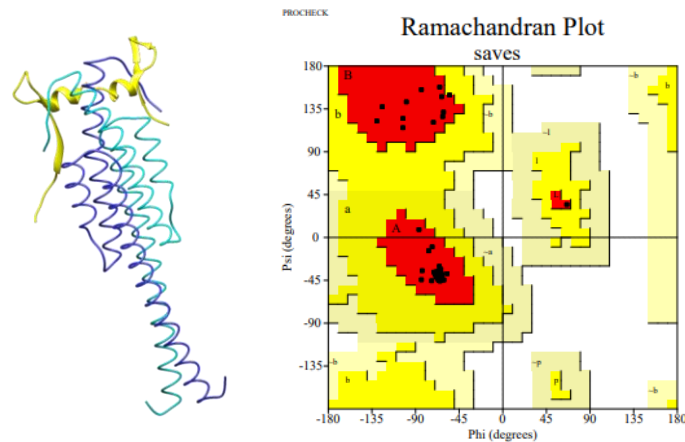
### Evaluación *in-silico* de mutantes de NSP3

Con el propósito de evaluar las construcciones de NSP3 mutantes realizadas en el laboratorio y proponer nuevas alternativas se modelaron todas estas mutantes y se evaluaron en experimentos *in-silico*. En estos experimentos se analizaron mutantes de NSP3 cuya energía de unión a su ligando (eIF4G o RNA viral) fue muy desfavorable (con respecto a la energía de unión de la NSP3 silvestre) lo que representó una baja posibilidad de interacción. Sin embargo, también se tuvieron en cuenta otros factores para predecir posibles interacciones, como el sitio de interacción, exposición de residuos hidrofóbicos o cambios drásticos en la estructura de la proteína.

En la figura 18 se observa el modelo del dominio C-terminal de NSP3 silvestre de RRV, utilizado como control en los ensayos de docking molecular. Este modelo se validó mediante el diagrama de Ramachandran, donde se observó que el 100% de los residuos se encuentran en la región más favorable. En el modelo se presentan cada una de las cadenas del homodímero de NSP3 en color azul (azul intenso y azul cian). Las cadenas amarillas corresponden al péptido de unión a NSP3 presente en el factor eIF4G. Como se observa en el modelo, el dominio C-terminal de NSP3 tiene dos sitios de unión para el factor eIF4G; sin embargo, es poco probable que NSP3 interaccione con 2 moléculas de eIF4G, ya que el eIF4G conforma un gran complejo

macromolecular junto con otros factores de la traducción, y es muy poco probable que dos de estos complejos puedan acercarse sin que se presente impedimento estérico. Además, no se conoce ninguna función celular o dentro del ciclo replicativo de RV que requiera de la unión de dos moléculas de eIF4G. Por otro lado, se puede apreciar que el dominio C-terminal de NSP3, es un dímero simétrico, es decir ambos sitios de unión, son idénticos. Por estas razones, los experimentos de docking molecular se hicieron calculando la energía de unión de una sola molécula de eIF4G a un sitio de unión en NSP3.

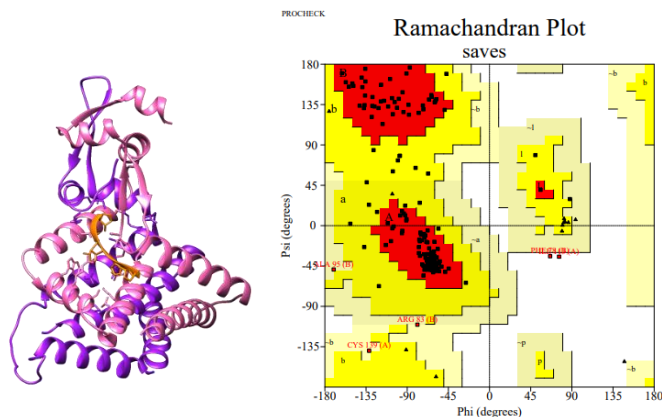
La energía de unión, reportada por el servidor HDOCK, entre la NSP3 silvestre de RRV y una molécula de eIF4G es de -242 Kcal/mol.



**Figura 18.** Modelo del dominion C-Terminal de NSP3 silvestre de RRV. Izquierda: Modelo del dimero de la proteina NSP3 (Dominio C-terminal. Ligando(amarillo): factor eIF4G). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 100% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

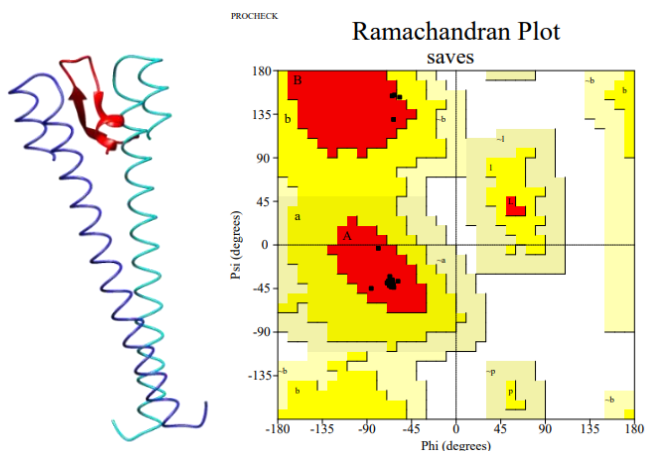
En la figura 19 se observa el modelo del dominio N-terminal de la NSP3 silvestre de RRV. Este dominio es un dímero asimétrico, donde cada una de las cadenas está representada con un color (morado y rosado). La cadena naranja corresponde a la secuencia consenso UGACC del RNA viral. Este modelo fue validado en el servidor PROCHECK mediante el diagrama de Ramachandran, donde se observa que el 91,6% de los residuos del modelo se ubicaron en su región más favorable, significando que el modelo es de buena calidad y puede ser tomado en cuenta.

El servidor HDOCK también permite calcular la energía de unión entre una proteína y un ácido nucleico, para este modelo la energía de unión fue -465 Kcal/mol.



**Figura 19.** Modelo del dominio N-terminal de NSP3 silvestre de RRV. Izquierda: Modelo del dímero de la proteína NSP3 (Dominio N-terminal. Ligando(Naranja): RNA viral). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 91.6% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

En la figura 20 se observa el modelo del dominio C-terminal de la proteína NSP3 con deleción en el dominio de unión a eIF4G. La cadena de color rojo corresponde al péptido del factor eIF4G que interacciona con NSP3, y las cadenas cian y azul intenso corresponden a las cadenas del dímero de NSP3. Este modelo fue validado a través del diagrama de Ramachandran donde se observó que el 98.3% de los residuos se encuentran en su región más favorable. La energía de interacción entre el péptido de eIF4G y el dímero de NSP3 fue de -201.6 Kcal/mol.

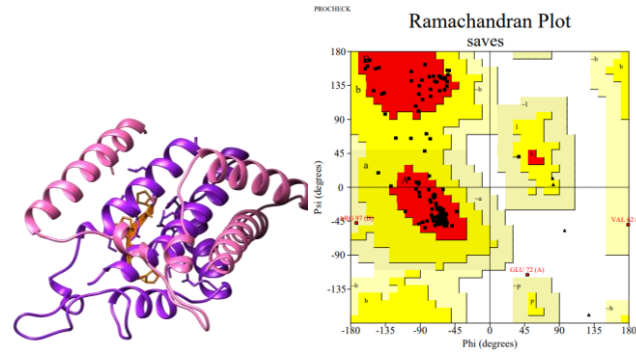


**Figura 20.** Modelo del dominio C-terminal de NSP3 con deleción en el dominio de unión a eIF4G (Delta4G). Izquierda: Modelo del dímero de la proteína NSP3 (Dominio C-terminal. Ligando(Rojo): factor eIF4G). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 98.3% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

A continuación (Figura 21), se muestra el modelo del dominio N-terminal de la proteína NSP3 con deleción en el dominio de unión a RNA. La cadena naranja corresponde a la secuencia consenso UGACC presente en los RNA virales; y las cadenas morada y rosada corresponden a cadenas del dímero de NSP3. Este modelo fue validado mediante el diagrama de Ramachandran

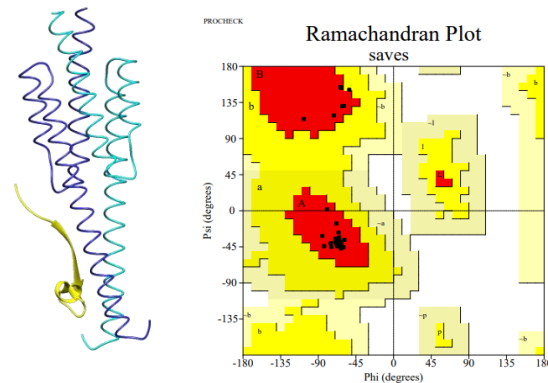
donde se observó que el 92.7% de los residuos se encuentran en su región más favorable, significando que el modelo es de buena calidad y puede ser tomado en cuenta.

El servidor HDOCK calculó una energía de unión entre el ácido nucleico y el dímero proteico de -208.5 Kcal/mol.



**Figura 21.** Modelo del dominio N-terminal de NSP3 con delección en el dominio de unión a RNA (DeltaRBD). Izquierda: Modelo del dímero de la proteína NSP3 (Dominio N-terminal. Ligando(Naranja): RNA viral). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 92.7% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

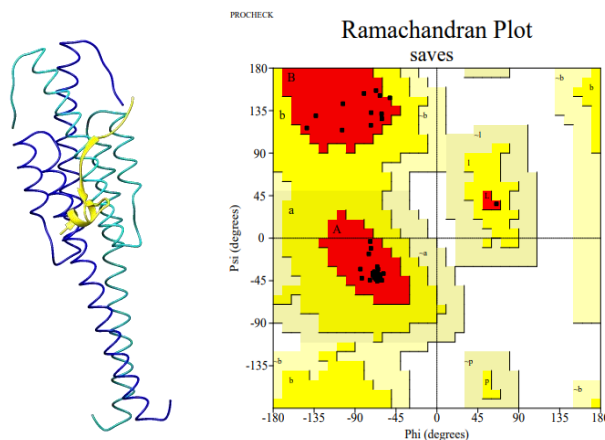
Con el objetivo de diseñar *in-silico* una mutante alternativa a la delección completa del dominio de unión a eIF4G (Figura 20), se propuso una NSP3 mutante, donde se eliminan los últimos 10 aminoácidos y se pierden los puentes de hidrogeno más importantes en su interacción con el factor eIF4G a lo largo de todo el dominio C-terminal. Sin embargo, a diferencia de la mutante con delección, esta mutante conserva la mayor parte de su estructura tridimensional semejante al NSP3 silvestre. La eliminación de los puentes de hidrogeno se llevó a cabo usando la herramienta LIGplot+, cambiando los aminoácidos que participaban en la formación de estos puentes por alaninas. En este ensayo el servidor HDOCK calculó una energía de unión entre ambas proteínas de -168.9 Kcal/mol. De igual manera, este modelo fue validado mediante el diagrama de Ramachandran donde se observó que el 98.9% de sus residuos de aminoácidos se encuentran en su región más favorable (Figura 22).



**Figura 22.** Modelo del dominio C-terminal de NSP3 mutante alternativa a la delección del dominio de unión a eIF4G (D-alternativa4G). Izquierda: Modelo del dímero de la proteína

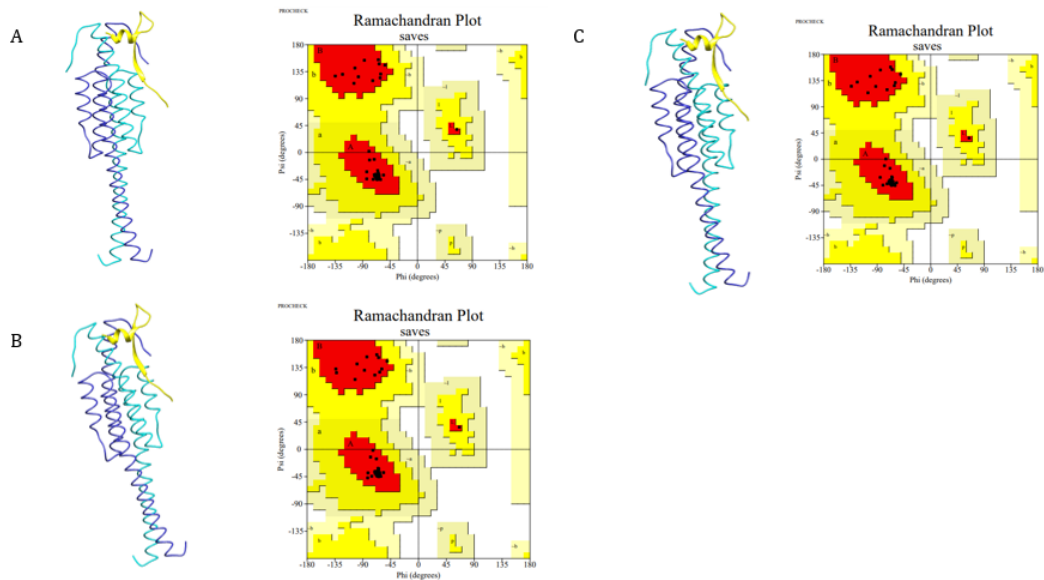
NSP3 (Dominio C-terminal. Ligando(amarillo): factor eIF4G). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 98.9% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

Adicionalmente, en el laboratorio ya se contaba con un plásmido en el contexto del sistema de genética reversa, que expresaba una NSP3 mutante, con cambios puntuales en 6 aminoácidos importantes en la interacción con el factor eIF4G<sup>68</sup>. Para evaluar esta mutante, se modeló (Figura 23), y se validó el modelo mediante el diagrama de Ramachandran donde se observó que el 100% de sus residuos de aminoácidos se encuentran en su región más favorable. Posteriormente, en el ensayo de docking molecular se obtuvo que la energía de unión entre el péptido del factor eIF4G y el dímero de NSP3 fue de -177 Kcal/mol. Asimismo, se pudo observar que la interacción entre estas dos proteínas se dio en un sitio diferente al sitio de unión reportado para la NSP3 silvestre.



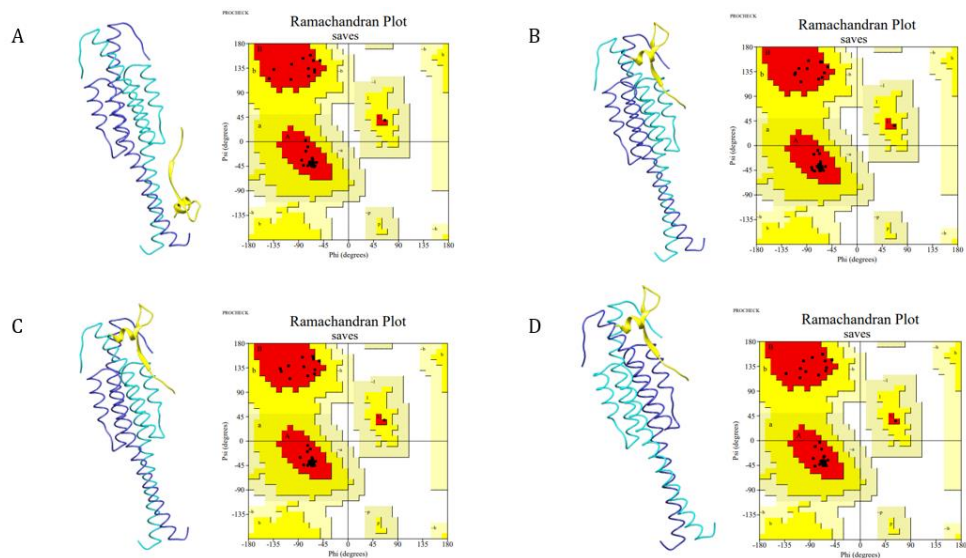
**Figura 23.** Modelo del dominio C-terminal de NSP3 con cambios puntuales en 6 aminoácidos de contacto con el factor eIF4G (6AA). Izquierda: Modelo del dímero de la proteína NSP3 (Dominio C-terminal. Ligando(amarillo): factor eIF4G). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 100% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

Al ver que la energía de unión en esta última construcción (Figura 23) se reduce de -242 Kcal/mol a -177 Kcal/mol, se quiso determinar cuáles eran los cambios en dichos puntos de contacto que el modelo podía tolerar sin aumentar drásticamente la energía de interacción entre las dos proteínas. Para esto, se probaron varias combinaciones de cambios en los puntos de contacto, y se encontró que los cambios Met298/Ala, y Leu302/Ala, no aumentaban drásticamente la energía de unión entre ambas proteínas (-231 Kcal/mol y -221 Kcal/mol respectivamente), y tampoco alteraban la estructura ni el sitio de interacción entre ellas. Ambos modelos fueron validados mediante diagramas de Ramachandran donde obtuvieron el 100% de sus residuos ubicados en la región más favorable. Adicionalmente, se construyó otro modelo que contenía los dos cambios Met298/Ala, y Leu302/Ala simultáneamente, el cual también contó con el 100% de sus residuos ubicados en la región más favorable y su energía de unión fue -221.8 Kcal/mol (Figura 24).



**Figura 24.** Los residuos Met298 y Leu302 no son importantes en la interacción de NSP3 con el factor eIF4G. (A) Construcción Met298/Ala, (B) Construcción Leu302/Ala, (C) Construcción Met298-Leu302/Ala

Para determinar los residuos de interacción más importantes dentro de estos 6 puntos de contacto (mutante 6AA) se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero esta vez se tomaron en cuenta los cambios que generaban mayor aumento en la energía de unión entre las dos proteínas o bien cambiaban el sitio de unión entre ellas. Se hicieron mutantes sencillas con cada uno de los 6 residuos y se encontró que Phe296, Phe299, Tyr308 y Tyr310 generaban cambios importantes. Cada uno de los modelos se validó mediante gráficos de Ramachandran, donde se obtuvo que todos los modelos tenían el 100% de sus residuos ubicados en la región más favorable.

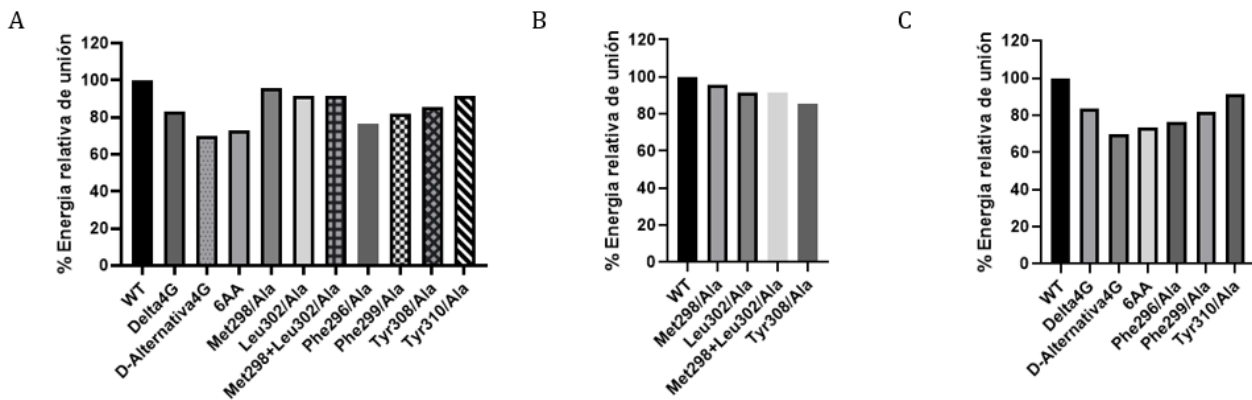


**Figura 25.** Los residuos Phe296, Phe299, Tyr308 y Tyr 310 son relevantes en la interacción de NSP3 con el factor eIF4G. (A) Construcción Phe296/Ala con -185 Kcal/mol de



energía de unión (B) Construcción Phe299/Ala con -198 Kcal/mol de energía de unión, (C) Construcción Tyr 308/Ala con -207 Kcal/mol de energía de unión, (D) Construcción Tyr 310/Ala con -221 Kcal/mol de energía de unión.

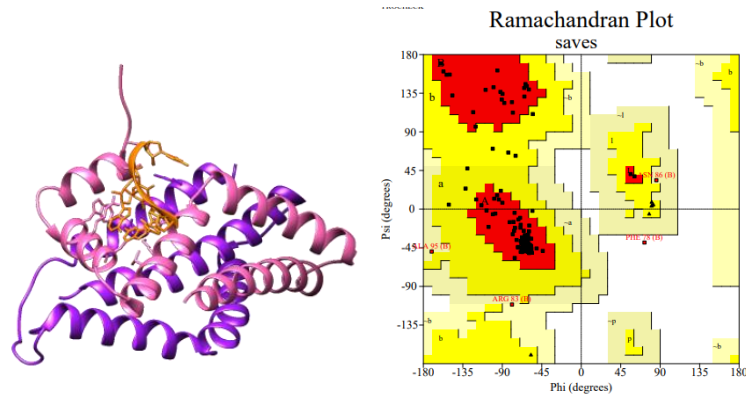
Para determinar cuáles mutantes podrían ser útiles en el estudio de la función del dominio de unión al factor eIF4G y desarrollarlas en el laboratorio, se compararon todas las energías de unión de las mutantes con respecto a la energía de la NSP3 silvestre; de igual manera se tuvo en cuenta las mutantes que alteraban la estructura terciaria de la proteína y/o que generaban cambios en el sitio de unión y se analizaron haciendo esta distinción. En la Figura 26, se puede observar que las mutantes 6AA y D-alternativa4G presentan las energías de interacción más desfavorables sin alterar drásticamente la estructura tridimensional de la proteína, siendo unas de las mejores opciones de mutantes alternativas a usar en el sistema de genética reversa.



**Figura 26.** Análisis de mutantes de NSP3 con cambios en el dominio de interacción con el factor eIF4G. (A) Todas las mutantes evaluadas *in-silico* (B) Mutantes donde no se alteró el sitio de interacción entre ambas proteínas, ni su estructura terciaria (C) Mutantes donde se alteró la estructura terciaria del dominio C-terminal de NSP3 y/o se cambió el sitio de unión entre NSP3 y eIF4G.

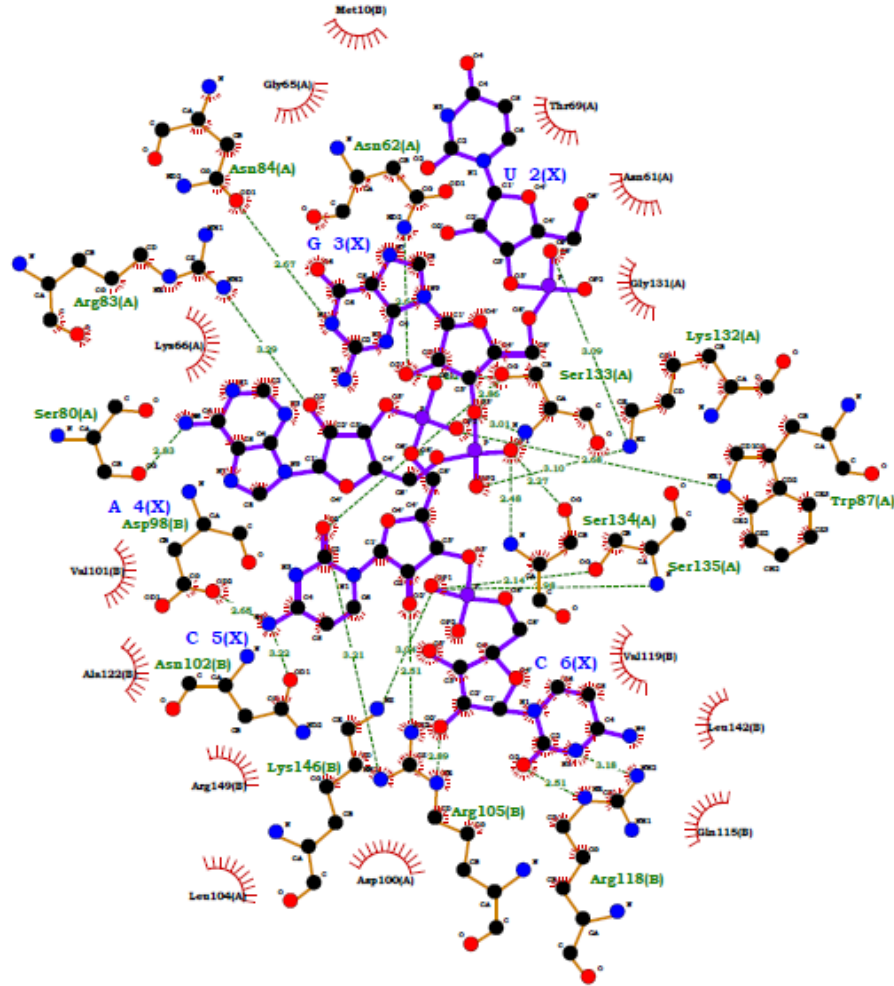
Debido a que la delección realizada en el dominio de unión a RNA abarca aproximadamente 100 aminoácidos (figura 21) y cambia completamente la estructura tridimensional del dominio N-terminal del dímero de NSP3, se decidió evaluar otras alternativas de mutantes *in-silico* que tuvieran cambios en el dominio de unión a RNA, conservando la mayor parte de su estructura tridimensional semejante a la silvestre. Inicialmente se probó una delección más pequeña de 41 aminoácidos (de Ser110 al Glu151) (Figura 27); Este modelo se validó con el 93.8% de residuos ubicados en la región más favorable según el diagrama de Ramachandran, y obtuvo una energía de unión al RNA de -311.9 Kcal/mol.



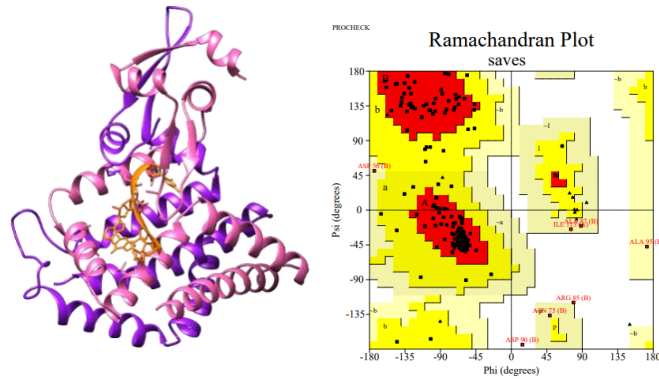


**Figura 27.** Propuesta de delección alternativa en el dominio de unión a RNA del dímero de NSP3 (D-alternativaRBD). Izquierda: Modelo del dímero de la proteína NSP3 (Dominio N-terminal. Ligando(Naranja): RNA viral). Derecha: Diagrama de Ramachandran con el 93.8% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

Con el objetivo de conseguir una mutante que no uniera el RNA viral pero que su estructura fuera semejante a la estructura de la NSP3 silvestre, se probaron cambios puntuales en los puntos de contacto del dímero con el RNA (Figura 28), estos puntos de contacto no pudieron ser determinados mediante cristalografía de rayos X, y por esta razón se analizó el dímero mediante el software LIGplot+ y se reemplazaron por alaninas todos los aminoácidos que participaban en la formación de puentes de hidrogeno con el RNA, a estos se les llamó puntos de contacto (Asn 84, Asn 62, Lys 132, Ser 133, Ser 134, Ser 135, Trp 87, Arg 105, Arg 118, Asn 102, Lys 146, Ser 80, Asp 98, Arg 83) . El modelo resultante se validó con el 90.9% de residuos ubicados en la región más favorable según el diagrama de Ramachandran, y obtuvo una energía de unión al RNA de -238.1 Kcal/mol (Figura 29).



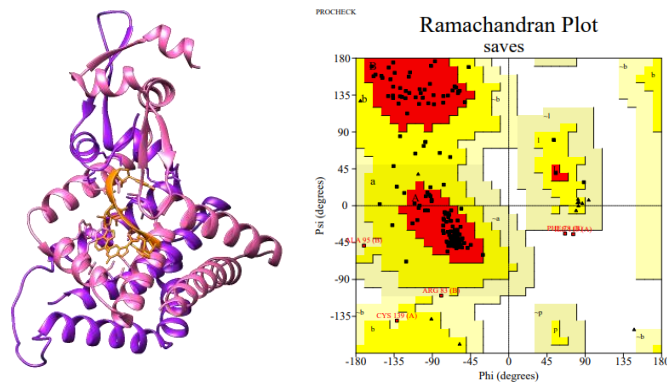
**Figura 28.** Puntos de contacto del dímero de NSP3 con la secuencia consenso UGACC del RNA viral. Las líneas verdes punteadas representan los puentes de hidrógenos formados entre los átomos del dímero y los del RNA.



**Figura 29.** Propuesta de mutante alternativa con cambios puntales en el dominio de unión a RNA de NSP3 (Alaninas). En el modelo de la izquierda los aminoácidos de los puntos de contacto (Asn 84, Asn 62, Lys 132, Ser 133, Ser 134, Ser 135, Trp 87, Arg 105, Arg 118, Asn 102, Lys

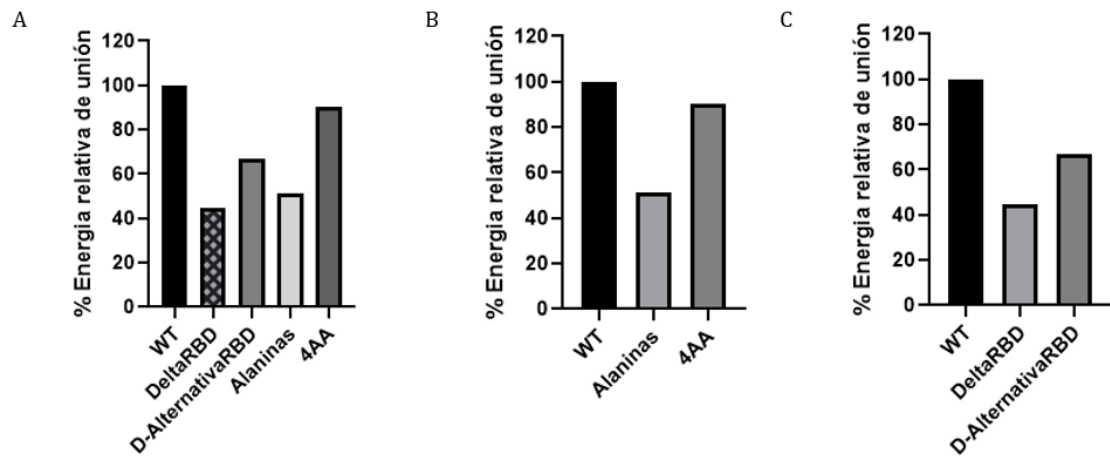
146, Ser 80, Asp 98, Arg 83) fueron reemplazados por alaninas. A la derecha se observa el diagrama de Ramachandran con el 90.9% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

Adicionalmente, se evaluó *in-silico* una última mutante cambiando solo 4 aminoácidos consecutivos por alaninas, estos eran los únicos residuos consecutivos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno entre NSP3 y el RNA, y por lo tanto, se ubican en un área de alta interacción entre ambas moléculas (Lys 132, Ser133, Ser134 y Ser135). El modelo resultante se validó con el 91.6% de residuos ubicados en la región más favorable según el diagrama de Ramachandran, y obtuvo una energía de unión al RNA de -418.5 Kcal/mol (Figura 30).



**Figura 30.** Propuesta de mutante alternativa con 4 cambios puntuales en el dominio de unión a RNA de NSP3 (4AA). En el modelo de la izquierda los aminoácidos de los puntos de contacto (Lys 132, Ser133, Ser134 y Ser135) fueron reemplazados por alaninas. A la derecha se observa el diagrama de Ramachandran con el 91.6% de los residuos del modelo (puntos negros) en la región más favorable (Rojo).

Finalmente, para determinar cuáles de estas mutantes podrían ser más útiles para estudiar la función del dominio de unión al RNA viral y desarrollarlas en el laboratorio, se compararon todas las energías de unión de las mutantes con respecto a la energía de la NSP3 silvestre; de igual manera se analizaron de forma separada las mutantes que comprometían la estructura terciaria de la proteína de las que solo eran cambios puntuales en aminoácidos de contacto, y se graficaron por separado. En la Figura 31, se observa que la mutante Alaninas presenta una de las energías de interacción más desfavorable sin alterar la estructura terciaria de la proteína, siendo la mejor mutante alternativa, del dominio N-terminal, a usar en el sistema de genética reversa.



**Figura 31.** Análisis de mutantes de NSP3 con cambios en el dominio de interacción con el RNA viral. (A) Todas las mutantes evaluadas *in-silico* (B) Mutantes donde no se alteró la estructura terciaria del dominio N-terminal de NSP3 (C) Mutantes alteraciones en la estructura terciaria del dominio N-terminal de NSP3.

## Discusión

La función de la proteína NSP3 de rotavirus ha sido debatida a lo largo de los últimos 20 años. Diferentes estudios con diferentes enfoques han intentado dilucidar el papel que cumple NSP3 en la traducción de proteínas virales y celulares. En este trabajo se optó por utilizar la herramienta de genética reversa junto con la construcción de diferentes mutantes de NSP3 que permitieran evaluar el papel de los dominios de interacción de esta proteína durante la infección por RV. A continuación, se discuten los hallazgos más relevantes obtenidos durante la realización de este trabajo.

La obtención de un título viral alto para el virus rearmado SA11/RRVNSP3 recién recuperado del sistema de genética reversa, requirió de varias rondas de replicación y de tiempos más prolongados de adsorción y crecimiento que los requeridos para los virus parentales (RRV y SA11). Es probable que estas distintas condiciones iniciales de crecimiento fueran necesarias para el virus SA11/RRVNSP3 se adaptara al crecimiento y propagación en cultivo celular. Posterior a las rondas iniciales de crecimiento, que permitieron la obtención de títulos virales altos, los 3 virus fueron evaluados bajo las mismas condiciones, de modo que se pudo comparar su comportamiento a lo largo de los diferentes experimentos.

Con el objetivo de caracterizar el virus rearmado SA11/NSP3RRV, se realizó un ensayo de progenie viral, donde se encontró que la curva de crecimiento del virus rearmado es similar a la curva de crecimiento de virus SA11, el cual aporta su fondo genético. De modo que la presencia de la proteína NSP3 codificada por RRV no impacta de manera significativa en el crecimiento del virus rearmado. En el ensayo de marcaje radiactivo de proteínas se pudo observar que tampoco encontramos una diferencia relevante entre los virus RRV, SA11 y SA11/RRVNSP3 en cuanto al fenotipo de síntesis de proteínas virales y apagado de síntesis de proteínas celulares. Es decir, a pesar de que hay diferencias en las secuencias de las proteínas NSP3 codificadas por RRV y SA11, ambas proteínas generan un comportamiento viral equivalente en cuando a la traducción de proteínas virales, y la regulación de la traducción de las proteínas del huésped. De modo que el virus rearmado SA11/RRVNSP3 es un control comparable con sus virus parentales, que puede ser usado en ensayos con otros virus rearmados recuperados por el sistema de genética reversa, que codifiquen para NSP3 mutantes.

En el ensayo de Western blot se confirmó que no hay diferencias significativas en la síntesis de proteínas virales entre los 3 virus. Sin embargo, se evidenció una diferencia en peso molecular de la proteína NSP3 expresada en el virus rearmado, debido a la presencia del elemento T2A en el plásmido de expresión. A pesar de ello, y tomando en cuenta los resultados mencionados anteriormente, se puede concluir que los 9 aminoácidos adicionados a la proteína NSP3 del virus rearmado no impactan en el comportamiento viral en cuanto a la traducción de proteínas virales, apagado de la síntesis de proteínas celulares o replicación viral.

Como se observa en la figura 17, el rearmado SA11/RRVNSP3 presenta un tamaño de placas similar al tamaño de las placas formadas por SA11. A pesar de que este es un resultado preliminar, ya que solo cuenta con 1 réplica, es consecuente con el resultado obtenido en el ensayo de progenie viral; nuevamente se evidencia que el comportamiento viral del rearmado es similar al de SA11, el virus que aporta su fondo genético, evidenciando que la presencia de NSP3 de RRV en el rearmado no repercute en el tamaño de las placas que forma este virus.

Para la evaluación de las mutantes de NSP3 con alteraciones en sus dominios de unión se realizaron experimentos *in-silico*, donde se modelaron inicialmente las NSP3 codificadas en los plásmidos contruidos en el laboratorio. Estas construcciones se basaron en trabajos previos de Vende y colaboradores, donde se determinó que proteínas NSP3 con deleciones en los aminoácidos del 1 al 163 y 290 al 313, no ejercían efecto en la traducción de proteínas<sup>69</sup>. Sin embargo, teniendo en cuenta que en estos estudios se expresaron estas NSP3 mutantes en *E.coli* y se empleó un sistema de traducción *in vitro*, era posible que al construir un RV que expresara estas proteínas, surgieran algunas dificultades relacionadas con el plegamiento de las mismas en el interior de una célula eucariota <sup>70</sup>. De igual manera, existe el debate de si las conclusiones obtenidas de estos experimentos *in-vitro*, son extrapolables o no, al contexto de la infección viral en una célula eucariota.

En la actualidad, las herramientas bioinformáticas han permitido el estudio *in-silico* de proteínas, lo cual abrió la posibilidad de estudiar, mediante docking molecular, nuevas propuestas de mutantes de NSP3 que fueran deficientes en la interacción con el factor eIF4G y el RNA viral, sin comprometer su estructura terciaria. Se sabe que RV produce grandes cantidades de proteínas y RNA viral en el interior del citoplasma celular, de modo que la presencia en grandes cantidades de una proteína mal plegada, con residuos hidrofóbicos expuestos, puede desencadenar estrés celular; adicionalmente, es probable que un mecanismo de respuesta celular ante la presencia de esta proteína, sea llevarla a degradación, alterando el tiempo de vida media de la proteína y, por ende, dificultando la interpretación de resultados.

Tomando todo lo anterior en cuenta, se diseñaron diferentes mutantes alternativas a las que construyeron originalmente, las cuales incluyen deleciones más pequeñas y cambios puntuales en los residuos más importantes de interacción. Todas las mutantes se evaluaron en base a la energía de unión obtenida en los experimentos de docking molecular, normalizando con la energía de unión de la NSP3 silvestre en cada una de las interacciones. A partir de las variaciones en la energía de unión de las mutantes respecto a la silvestre, se realizaron las siguientes predicciones, sin embargo, es importante resaltar que estos supuestos deben ser confirmados con datos experimentales.

#### *Mutantes de NSP3 con cambios en el dominio de unión al Factor eIF4G*

Los estudios de Vende y colaboradores<sup>69</sup>, demostraron que la mutante Delta4G falla en la interacción con el factor eIF4G, y por ende presenta una función alterada en el sistema de traducción de proteínas *in-vitro*. Sin embargo, esta deleción compromete la mayor parte de su estructura terciaria, dejando una gran cantidad de residuos hidrofóbicos expuestos, y alterando la dimerización del dominio de unión. Una mutante con, incluso, una energía de unión más desfavorable que ésta, pero que a su vez mantiene la mayor parte de su estructura terciaria inalterada sería la mutante D-alternativa.

Entre las mutantes alternativas que no presentan ninguna deleción, solo cambios puntales, las mejores opciones serían la mutante 6AA y Phe296/Ala, ya que presentan una energía de unión desfavorable, cercana a la reportada para Delta4G, y a su vez conservan al mayor parte de la secuencia y estructura de la proteína silvestre.

#### *Mutantes de NSP3 con cambios en el dominio de unión a la secuencia consenso UGACC del RNA viral*

En los estudios de Vende y colaboradores<sup>69</sup>, se evidenció que la mutante DeltaRBD falla en la interacción con el RNA viral y, por ende, se observa una función alterada en el sistema de traducción de proteínas *in-vitro*. Sin embargo, esta delección comprende aproximadamente 100 aminoácidos; con el objetivo de conservar la mayor parte de la secuencia y la estructura de la NSP3 silvestre, se diseñó una delección alternativa de 41 aminoácidos, D-alternativa, la cual también presenta una energía de unión bastante desfavorable, pero no tanto como la construcción DeltaRBD.

Adicionalmente, se desarrollaron otras mutantes alternativas, las cuales solo contenían cambios puntuales en los residuos de contacto, entre estas, la mejor opción sería la mutante de alaninas, la cual presenta una energía de unión bastante desfavorable, cercana a la energía de unión de DeltaRBD, y a su vez conservan al mayor parte de la secuencia y estructura de la proteína silvestre.

De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que este trabajo proporciona las bases necesarias para la recuperación y evaluación de diferentes rotavirus mutantes con cambios en la proteína no estructural NSP3, lo que permitirá esclarecer la función de los dominios de interacción de esta proteína durante la infección viral.

## Conclusiones

Los virus RRV, SA11, y SA11/RRVNSP3 tienen curvas de crecimiento semejantes, expresan la misma cantidad de proteínas virales y apagan la traducción de proteínas celulares de manera semejante.

El virus rearreglante SA11/RRVNSP3 evidenció ser comparable con los virus parentales en experimentos para evaluar la traducción de proteínas. Por ende, puede ser usado como control en otros experimentos de este tipo que involucren virus rearreglantes, recuperados del sistema de genética reversa, que expresen NSP3 mutantes.

La proteína NSP3 de RRV codificada en el virus rearreglante no impacta en su cinética de crecimiento. El virus rearreglante presenta un crecimiento similar a SA11 el virus que aporta su fondo genético.

Los análisis *in-silico* soportan que la construcción NSP3 RRV  $\Delta$ 4G realizada en el laboratorio es deficiente en la interacción con el factor eIF4G, y a su vez revelan la presencia de grandes alteraciones a la estructura terciaria de la proteína NSP3 en esta construcción.

Los análisis *in-silico* soportan que la construcción NSP3 RRV  $\Delta$ RBD realizada en el laboratorio es deficiente en la interacción con el RNA viral, y a su vez revelan la presencia de grandes alteraciones a la estructura terciaria de la proteína NSP3 en esta construcción.

Las predicciones de docking molecular con mutantes alternativas generadas *in-silico*, ofrecen una variedad de opciones prometedoras de mutantes de NSP3, que pueden desarrollarse en el laboratorio, como alternativas para el sistema de genética reversa.



## Perspectivas

Las predicciones *in-silico* del comportamiento de las mutantes de NSP3 ofrecen información útil que permitirá seleccionar las mejores mutantes para ser introducidas en el sistema de genética reversa, permitiendo la recuperación de virus mutantes y su futura evaluación en el contexto de la infección viral.

El papel de la proteína NSP3 y de sus diferentes dominios de interacción se ha estudiado a lo largo de las últimas dos décadas; y aunque la mayoría estudios se han centrado en sus dos dominios de interacción más representativos, el dominio C-terminal y el dominio N-terminal, sería interesante usar el sistema de genética reversa para explorar las funciones de la región *coiled-coil* y sus interacciones.

La necesidad de trabajar con virus rearreglantes responde a la falta de un sistema de genética de reversa que pueda recuperar RRV con eficiencia, sería interesante probar diferentes condiciones y estrategias para lograr la recuperación de virus RRV.

El reciente desarrollo de un sistema de genética reversa para los Rotavirus abre un gran abanico de posibilidades en el estudio de las proteínas virales y su función. Estandarizar diferentes sistemas de transcomplementación permitiría el máximo aprovechamiento de esta herramienta en la comprensión y entendimiento de estos virus.

## Bibliografía

1. Crawford, S. E. *et al.* Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17083 (2017).
2. Riera-Montes, M., O’Ryan, M. & Verstraeten, T. Norovirus and Rotavirus Disease Severity in Children: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **37**, 501–505 (2018).
3. Aliabadi, N. *et al.* Global impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus hospitalisations among children under 5 years of age, 2008–16: findings from the Global Rotavirus Surveillance Network. *Lancet Glob. Heal.* **7**, e893–e903 (2019).
4. Tate, J. E. *et al.* Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clin. Infect. Dis.* **62**, S96–S105 (2016).
5. O’Ryan, M. Rotavirus Vaccines: A story of success with challenges ahead. *F1000Research* **6**, 1–9 (2017).
6. Sederdahl, B. K., Orenstein, W. A., Yi, J., Anderson, E. J. & Bednarczyk, R. A. Missed opportunities for rotavirus vaccination. *Pediatrics* **143**, (2019).
7. Richardson, V. *et al.* Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N. Engl. J. Med.* **362**, 299–305 (2010).
8. Gastañaduy, P. A. *et al.* Effect of rotavirus vaccine on diarrhea mortality in different socioeconomic regions of Mexico. *Pediatrics* **131**, (2013).
9. Gómez Altamirano, C. M. & Carrión Falcón, V. Panorama epidemiológico de la gastroenteritis por rotavirus y la invaginación intestinal en México. *Acta Pediátrica México* **40**, 59 (2019).
10. Desselberger, U. Rotaviruses Review. *Virus Res.* **190**, 75–96 (2014).
11. Rivero-Calle, I., Gómez-Rial, J. & Martínón-Torres, F. Systemic features of rotavirus infection. *J. Infect.* **72**, S98–S105 (2016).
12. Chen, C. C., Huang, J. L., Chang, C. J. & Kong, M. S. Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **55**, 541–547 (2012).
13. Tafazoli, F., Zeng, C. Q., Estes, M. K., Magnusson, K.-E. & Svensson, L. NSP4 Enterotoxin of Rotavirus Induces Paracellular Leakage in Polarized Epithelial Cells. *J. Virol.* **75**, 1540–1546 (2001).
14. Hagbom, M. *et al.* Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* **7**, 1–10 (2011).
15. Guarino, A. *et al.* The management of acute diarrhea in children in developed and developing areas: From evidence base to clinical practice. *Expert Opin. Pharmacother.* **13**, 17–26 (2012).
16. Kordasti, S., Sjövall, H., Lundgren, O. & Svensson, L. Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut* **53**, 952–957 (2004).
17. Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 165–177 (2012).
18. Ayala-Breton, C. *et al.* Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference. *J. Virol.* **83**, 8819–8831 (2009).
19. Beards, G. Rotavirus. **4**, 0–2 (2017).
20. Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K. & Venkataram Prasad, B. V. Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **309**, 189–219 (2006).
21. Long, C. P. & McDonald, S. M. Rotavirus genome replication: Some assembly required. *PLoS Pathog.* **13**, 1–6 (2017).
22. Gratia, M. *et al.* Challenging the roles of nsp3 and untranslated regions in rotavirus mRNA

- translation. *PLoS One* **11**, 1–24 (2016).
23. Johne, R., Reetz, J., Kaufer, B. B. & Trojnar, E. Generation of an Avian-Mammalian Rotavirus Reassortant by Using a Helper Virus-Dependent Reverse Genetics System. *J. Virol.* **90**, 1439–1443 (2016).
  24. Vijaykrishna, D., Mukerji, R. & Smith, G. J. D. RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLoS Pathog.* **11**, 1–6 (2015).
  25. Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. Rotavirus non-structural proteins: Structure and function. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 380–388 (2012).
  26. Kumar, M. *et al.* Crystallographic and Biochemical Analysis of Rotavirus NSP2 with Nucleotides Reveals a Nucleoside Diphosphate Kinase-Like Activity. *J. Virol.* **81**, 12272–12284 (2007).
  27. Vasquez-Del Carpio, R., Gonzalez-Nilo, F. D., Riadi, G., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. Histidine Triad-like Motif of the Rotavirus NSP2 Octamer Mediates both RTPase and NTPase Activities. *J. Mol. Biol.* **362**, 539–554 (2006).
  28. Taraporewala, Z., Chen, D. & Patton, J. T. Multimers Formed by the Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Bind to RNA and Have Nucleoside Triphosphatase Activity. *J. Virol.* **73**, 9934–9943 (1999).
  29. Ousingsawat, J. *et al.* Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na<sup>+</sup> absorption. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **461**, 579–589 (2011).
  30. Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D. & Cohen, J. Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2. *J. Virol.* **77**, 1757–1763 (2003).
  31. Torres-Vega, M. A. *et al.* The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* **81**, 821–830 (2000).
  32. Komoto, S. *et al.* Reverse Genetics System Demonstrates that Rotavirus Nonstructural Protein NSP6 Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture. *J. Virol.* **91**, (2017).
  33. Fleming, F. E. *et al.* Relative Roles of GM1 Ganglioside, N-Acylneuraminic Acids, and 2 1 Integrin in Mediating Rotavirus Infection. *J. Virol.* **88**, 4558–4571 (2014).
  34. Zarate, S. *et al.* Interaction of Rotaviruses with Hsc70 during Cell Entry Is Mediated by VP5. *J. Virol.* **77**, 7254–7260 (2003).
  35. Torres-Flores, J. M., Silva-Ayala, D., Espinoza, M. A., López, S. & Arias, C. F. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology* **475**, 172–178 (2015).
  36. Lopez, T., Silva-Ayala, D., Lopez, S. & Arias, C. F. Replication of the Rotavirus Genome Requires an Active Ubiquitin-Proteasome System. *J. Virol.* **85**, 11964–11971 (2011).
  37. Arnold, M. M., Brownback, C. S., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *J. Gen. Virol.* **93**, 1483–1494 (2012).
  38. Contreras-Treviño, H. I. & Padilla-Noriega, L. Regulación de la traducción mediada por la proteína NSP3 de rotavirus. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **21**, 124–133 (2018).
  39. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–127 (2010).
  40. López, S., Ocegüera, A. & Sandoval-Jaime, C. Stress response and translation control in rotavirus infection. *Viruses* **8**, (2016).
  41. Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Yusupov, M. M., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J.* **27**, 1609–1621 (2008).
  42. Walsh, D. & Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 860–875 (2011).

43. Poncet, D. II, 5. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell. *Perspect. Med. Virol.* **9**, 185–205 (2003).
44. Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F.* *The EMBO Journal* vol. 17 (1998).
45. Harb, M. *et al.* Nuclear Localization of Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein upon Rotavirus Infection Involves the Interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.* **82**, 11283–11293 (2008).
46. López, S., Ocegüera, A. & Sandoval-Jaime, C. Stress response and translation control in rotavirus infection. *Viruses* **8**, (2016).
47. Kanai, Y. *et al.* Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 2343–2348 (2017).
48. Komoto, S. *et al.* Generation of Recombinant Rotaviruses Expressing Fluorescent Proteins by Using an Optimized Reverse Genetics System. *J. Virol.* **92**, e00588-18 (2018).
49. Kendrew, J. C. *et al.* A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662–666 (1958).
50. Pauling, L. & Corey, R. B. Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 729–740 (1951).
51. Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J. & Derome, N. A brief history of bioinformatics. *Brief. Bioinform.* **20**, 1981–1996 (2019).
52. Murakami, Y., Tripathi, L. P., Prathipati, P. & Mizuguchi, K. Network analysis and in silico prediction of protein–protein interactions with applications in drug discovery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **44**, 134–142 (2017).
53. Wrobel, R. L. *et al.* *Structural Proteomics. Plant Proteomics* (2007). doi:10.1002/9780470988879.ch5.
54. Pieper, U. *et al.* MODBASE: a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. doi:10.1093/nar/gkj059.
55. Mart, M. A., Stuart, A. C., Roberto, S., Melo, F. & Andrej, S. C p s m g g. 291–325 (2000).
56. Janes, R. W. Bioinformatics analyses of circular dichroism protein reference databases. *Bioinformatics* **21**, 4230–4238 (2005).
57. Díaz Caballero, A. *et al.* Modelación por homología de la proteína Luxs de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. *Rev. clínica periodoncia, Implantol. y Rehabil. oral* **5**, 105–113 (2012).
58. Phatak, S. S., Stephan, C. C. & Cavasotto, C. N. Screenings in Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **4**, 947–959 (2009).
59. Torrez, G. & Enrique<sup>1</sup>, R. Ballón Paucara, Wendy Guadalupe<sup>1</sup>. **7**, 55–72 (2019).
60. Lill, M. A. Efficient incorporation of protein flexibility and dynamics into molecular docking simulations. *Biochemistry* **50**, 6157–6169 (2011).
61. Warren, G. L. *et al.* A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J. Med. Chem.* **49**, 5912–5931 (2006).
62. Yan, Y., Tao, H., He, J. & Huang, S. Y. The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nat. Protoc.* **15**, 1829–1852 (2020).
63. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **8**, 127–134 (1995).
64. RA, L. & MB, S. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2778–2786 (2011).
65. Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzmán-León, S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* **298**, 1–7 (2002).
66. Montero, H., Arias, C. F. & Lopez, S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 Is Not

- Required for Viral Protein Synthesis. *J. Virol.* **80**, 9031–9038 (2006).
67. Rubio, R. M., Mora, S. I., Romero, P., Arias, C. F. & Lopez, S. Rotavirus Prevents the Expression of Host Responses by Blocking the Nucleocytoplasmic Transport of Polyadenylated mRNAs. *J. Virol.* **87**, 6336–6345 (2013).
  68. Groft, C. M. & Burley, S. K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* **9**, 1273–1283 (2002).
  69. Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End. *J. Virol.* **74**, 7064–7071 (2000).
  70. Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-hartl, M. & Hartl, F. U. Heat Shock Response. 1–19 (2010).