

Cómo contienden los virus con el estrés

Marta Argüello, Hilda Montero, Carlos Arias y Susana López

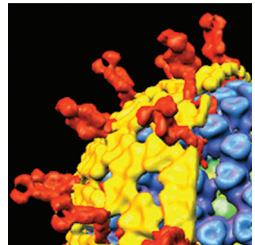
Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen de la maquinaria celular para replicarse. Al entrar a su célula huésped e infectarla, los virus despiertan en la célula una serie de señales de estrés, y en respuesta a estas señales la célula trata de combatir el estrés y defenderse de la infección viral utilizando diversos mecanismos. Los virus, a su vez, han desarrollado medidas de contra-defensa para contrarrestar los mecanismos que se activan en la célula huésped, para replicarse de manera eficiente. Los rotavirus, el principal agente de gastroenteritis aguda en la niñez no son la excepción y al infectar a las células intestinales despiertan una serie de señales de estrés en su huésped, con las que tiene que contender para poder replicarse exitosamente.

Conocer las medidas de control que ejerce la célula ante el estrés provocado por la infección con rotavirus e identificar cuáles son las medidas de contraataque que utilizan los rotavirus, nos podría sugerir blancos terapéuticos para controlar la severidad de la infección causada por rotavirus. En este capítulo revisaremos algunos elementos básicos de la traducción de proteínas, cuáles son los mecanismos que utiliza la célula para responder de

una manera integrada ante señales de estrés, y cómo algunos virus son capaces de modular esta respuesta.

Síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas es la última etapa en el flujo de la información genética. Los eventos de transcripción y traducción son regulados de manera eficiente dentro de la célula y dependen de las condiciones ambientales y fisiológicas que la rodean. A diferencia del control transcripcional, la regulación traduccional permite una rápida respuesta a cambios en las condiciones fisiológicas y se lleva a cabo principalmente en el nivel de la iniciación de la traducción. La traducción de los mRNA eucarióticos está mediada por los factores de iniciación eucarióticos (eIFs). El factor eIF2 es uno de los puntos clave en la regulación traduccional, ya que es el encargado de colocar el primer aminoácido (la metionina iniciadora) de las proteínas durante el inicio de la traducción. Este factor está formado por tres subunidades (α , β y γ) y puede ser fosforilado en la subunidad α . Dicha fosforilación es una señal que regula el inicio de la traducción, ya que cuando este factor se encuentra fosforilado no puede interactuar con el RNA de transferencia



(tRNA) que acarrea la metionina iniciadora y, por lo tanto, se bloquea la síntesis de proteínas (**figura 1**). Existen cuatro cinasas celulares que pueden fosforilar eIF2 α bajo diferentes condiciones de estrés: la PKR (protein kinase represor), que se activa en presencia de RNA de doble cadena, principalmente ante las infecciones de virus; la GCN2, que se activa cuando hay una disminución en los nutrientes en el medio, por ejemplo cuando hay una baja concentración de aminoácidos o glucosa; la HRI, que se activa por choque térmico o por deficiencia de hierro intracelular, y la PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), la cual es activada en respuesta a condiciones de estrés de retículo endoplásmico (RE) (**figura 2**). En todos estos casos, la activación de estas cinasas tiene como consecuencia la fosforilación de la subunidad α del factor eIF2 y por lo tanto la inhibición de la síntesis de proteína celular. Paradójicamente, la fosforilación de eIF2 α favorece la traducción de algunos RNA mensajeros que codifican para proteínas que participan en la adaptación a las condiciones de estrés y en la recuperación de la traducción (**figura 2**). Así, cuando eIF2 se encuentra fosforilado, se estimula la traducción de un factor transcripcional ATF4, cuya función es favorecer que cierto grupo de genes sean transcritos y expresados para ayudar a la recuperación de la célula después del estrés, tales como proteínas conocidas como chaperonas, cuya función es ayudar al correcto plegamiento de las proteínas mal plegadas que se encuentran en el lumen del RE. Otra proteína importante que es sintetizada durante el estrés es GADD34, la cual forma un complejo con la fosfatasa PP1, y cuya función es defosforilar el factor eIF2 y, así, reiniciar la síntesis de proteína celular.

Estrés y UPR

Normalmente las células se enfrentan con un gran número de condiciones de estrés ambiental o fisiológico con las que tienen que contener y para las que han desarrollado un conjunto de respuestas adaptativas. La exposición de las células a condiciones de temperaturas ex-

tremas, falta de oxígeno o de nutrientes, infecciones virales, etc., induce cascadas de señales que le indican a la célula la situación de emergencia en la que se encuentra y que le permiten, a su vez, responder mediante un conjunto de respuestas coordinadas que le permitirán adaptarse y soportar temporalmente las condiciones estresantes.

En general el retículo endoplásmico (RE) es el organelo celular que integra las señales que recibe la célula, y es ahí donde se inicia y se coordina la respuesta al estrés. En el RE se lleva a cabo el plegamiento y la modificación post-traducciona de aproximadamente un tercio de todas las proteínas de la célula. Se ha observado que la acumulación de proteínas mal plegadas, ya sea por ser proteínas defectuosas, o porque se producen más rápido de lo que se pueden plegar y modificar correctamente, causa un estrés en este organelo y da lugar a la activación de una respuesta adaptativa coordinada de la célula, a la que se le ha llamado la *respuesta a proteínas mal plegadas* o UPR (unfolded protein response).

La función de la UPR es la de aliviar el estrés en el RE y esto se lleva a cabo, por un lado, sobre-expresando chaperonas y factores involucrados en la degradación de proteínas (para deshacerse de aquellas proteínas que no pueden ser reparadas); y, por otro, disminuyendo considerablemente la síntesis de proteínas para detener su acumulación en el RE. Es importante mencionar que si la célula no se recupera de los daños ocasionados por el estrés, se inician programas que conducen a la muerte celular.

Recientemente se identificaron tres proteínas residentes del RE como los sensores de estrés en este organelo. Normalmente estas tres proteínas transmembranales se encuentran asociadas a la proteína chaperona llamada BiP o grp78, que se encuentra en el lumen del RE. Cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el RE, BiP se une a las proteínas defectuosas y libera a los tres sensores que mencionamos, permitiendo su activación (**figura 3**). Mencionaremos algunas características de estos y sus funciones:

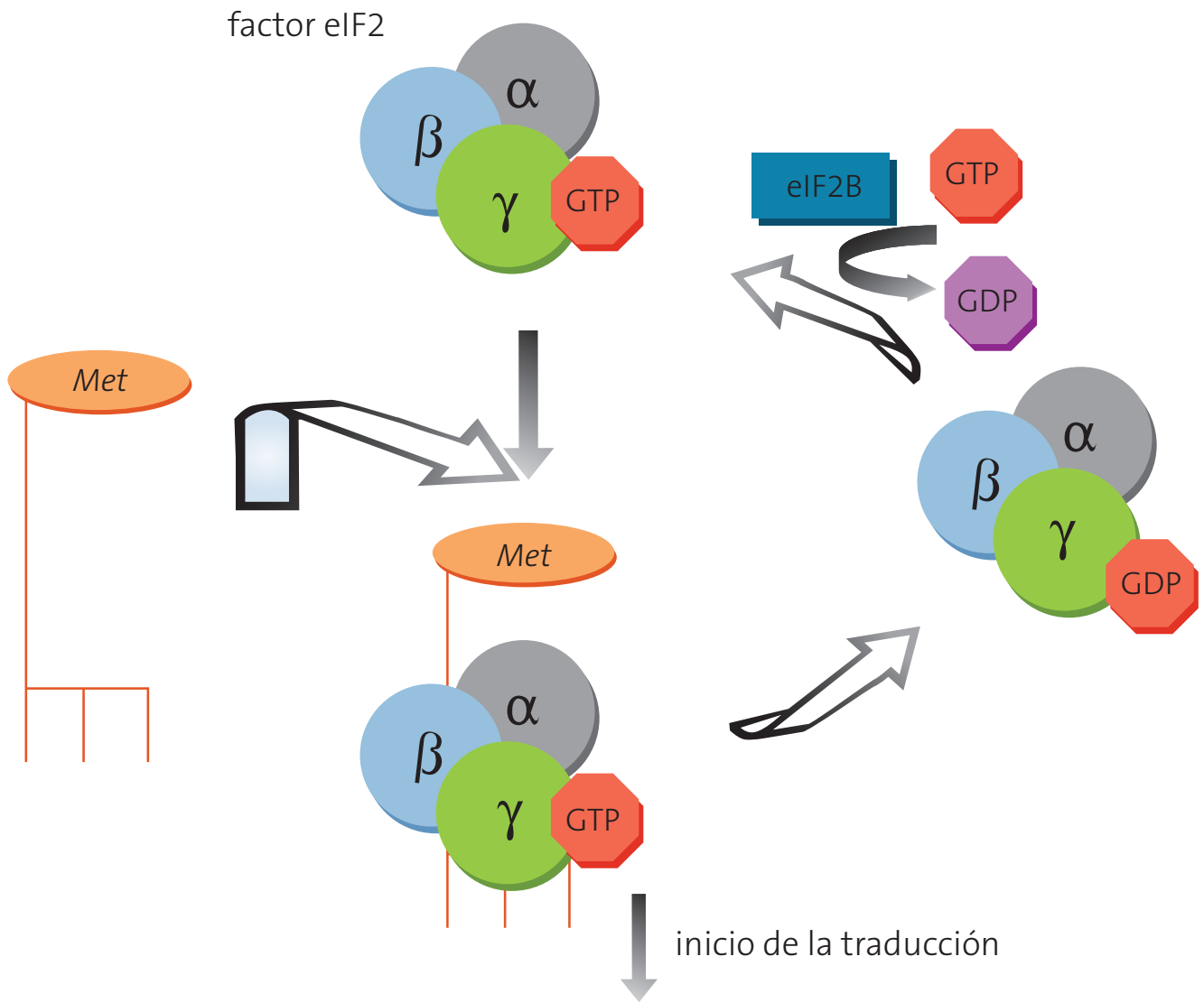


Figura 1.

El factor de traducción eIF2, formado por tres subunidades (α , β y γ), se asocia con GTP y el tRNA-metionina iniciador, formando el complejo ternario. Cuando este complejo deposita el tRNA-met sobre el mRNA, que inicia propiamente la síntesis de proteínas, se hidroliza el GTP y se libera eIF2 unido a GDP. El eIF2-GDP es reciclado a eIF2-GTP mediante el factor eIF2B, para así volver a su ciclo funcional al unirse a un nuevo tRNA-met.

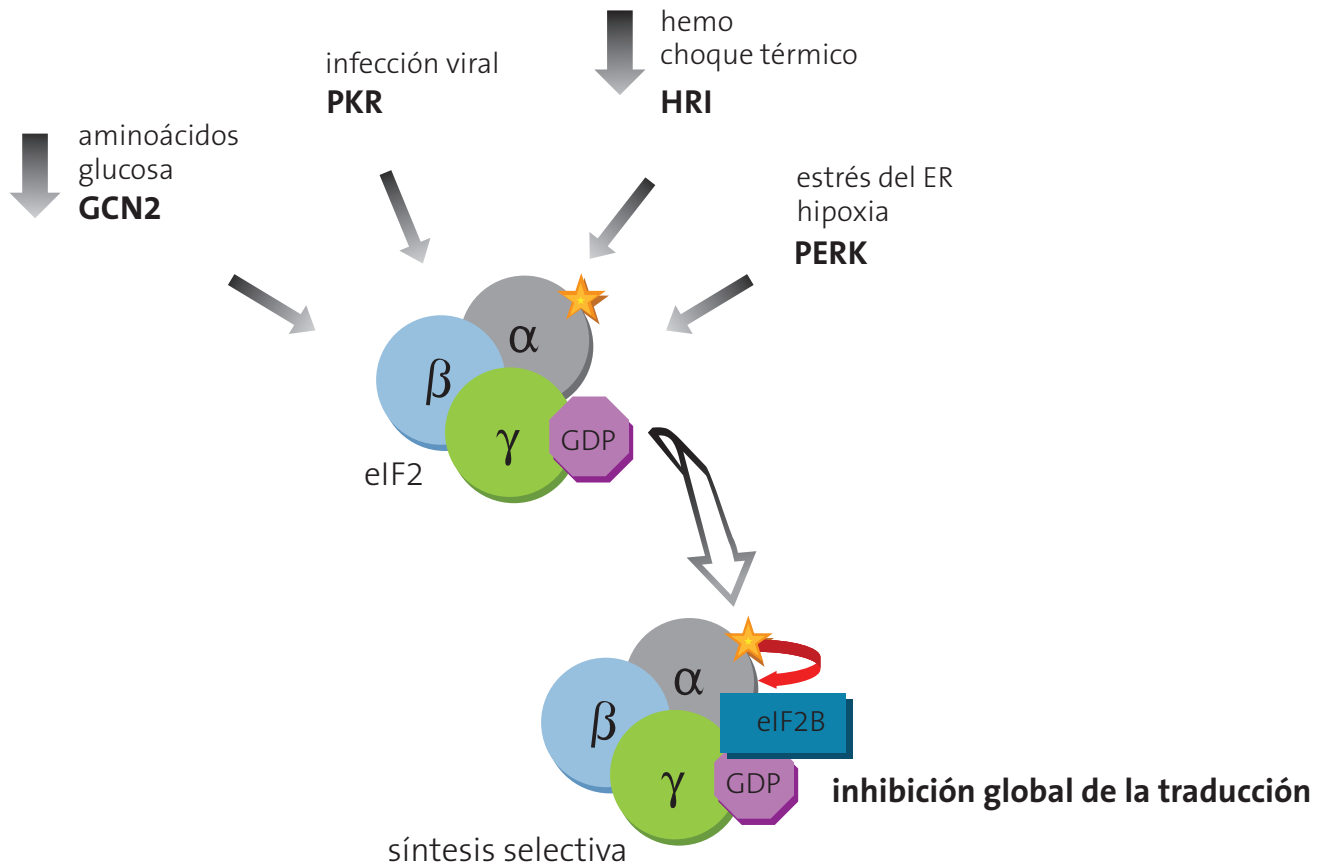


Figura 2. Cinasas celulares que fosforilan a eIF2 α bajo diferentes condiciones de estrés: GCN2, PKR, HRI y PERK. La fosforilación de la subunidad α del factor eIF2 por cualquiera de estas cinasas tiene como consecuencia la inhibición global de la síntesis de proteína celular, ya que eIF2 α fosforilado se une con gran afinidad a eIF2B, se inhibe el reclutamiento de GDP por GTP y no se puede formar el complejo ternario (figura 1). Sin embargo la fosforilación de eIF2 α favorece la traducción de algunos RNA mensajeros que codifican para proteínas que participan en la adaptación a las condiciones de estrés y en la recuperación de la traducción.

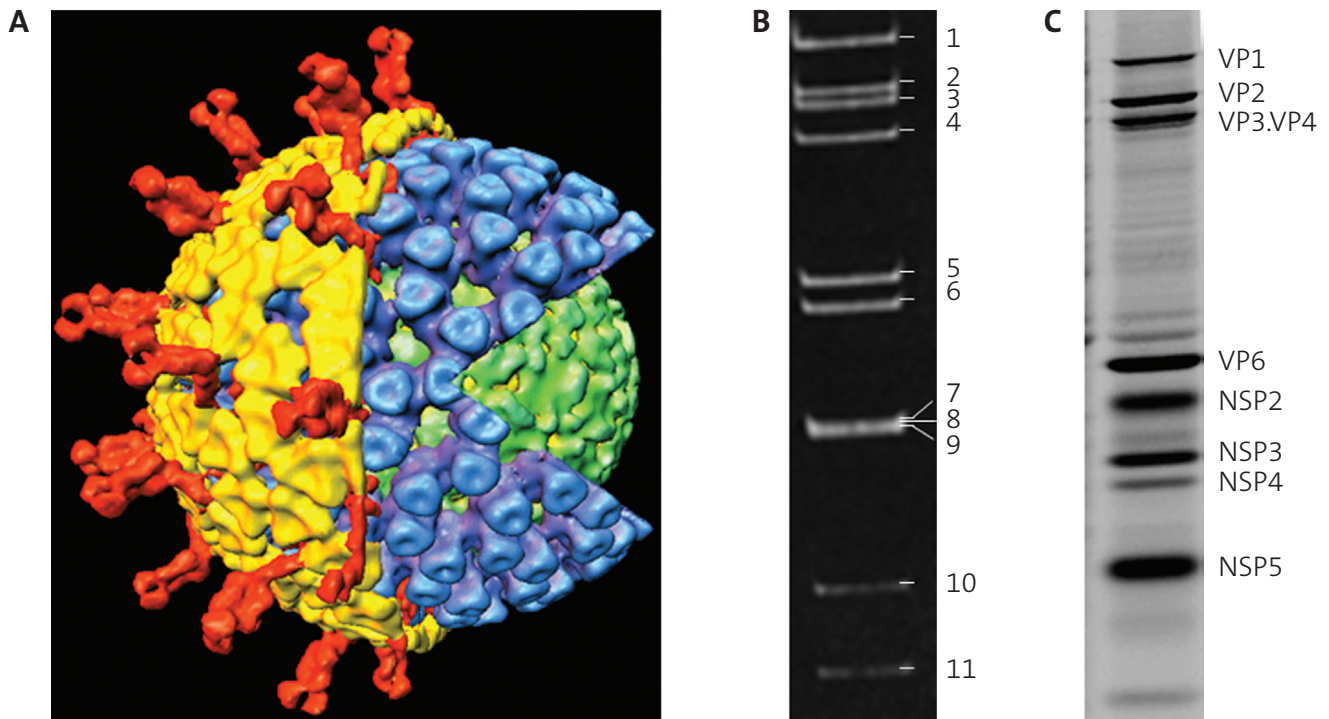


Figura 3.

Estructura y composición de rotavirus. A) Criomicroscopía electrónica de una partícula viral. La capa más externa está formada por VP7 (en amarillo), las espículas de VP4 (en naranja), la capa intermedia de VP6 (en azul). B) Patrón electroforético del genoma viral teñido con bromuro de etidio; los números indican el número de gene viral. C) Patrón electroforético de las proteínas virales sintetizadas en una célula infectada (VP indican las proteínas estructurales y NSP las proteínas no estructurales).

ATF6 es una proteína que en condiciones de estrés es transportada al aparato de Golgi (otro organelo celular membranoso que podríamos definir como la continuación del retículo endoplásmico), donde es cortada por proteasas presentes en este lugar. Posteriormente, ATF6, ya procesada, es enviada al núcleo de la célula, donde funciona como activador transcripcional de genes que codifican para proteínas chaperonas que, como mencionamos anteriormente, son necesarias para ayudar en el correcto doblamiento de las proteínas mal plegadas que se han acumulado en el RE y, por lo tanto, ayudan a la recuperación de los daños ocasionados por el estrés.

La proteína IRE1 es una endonucleasa que, una vez que se activa durante el estrés, remueve un fragmento de 26 nucleótidos del mRNA que codifica para la proteína XBP1, que a su vez es también un factor transcripcional que activa la transcripción de genes que codifican para proteínas que participan en la degradación de proteínas mal plegadas.

Finalmente PERK, que como ya mencionamos anteriormente, es una proteína cinasa cuya función es fosforilar eIF2 α . En el contexto de estrés en el retículo endoplásmico, la célula responde activando PERK, lo que ocasiona una inhibición global en la síntesis de proteínas por medio de la fosforilación de eIF2, que es un factor limitante para la traducción de proteínas. El inhibir la síntesis de proteínas durante el estrés evita que se sigan acumulando proteínas en el RE y alivia la carga de las chaperonas que están plegando las proteínas ya existentes.

Virus y UPR

Como parásitos obligados, los virus dependen completamente de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula para la producción de sus propias proteínas, de manera que el éxito en la replicación de un virus depende de que los mensajeros virales sean capaces de competir favorablemente con los mensajeros celulares por la maquinaria de síntesis del huésped. Los virus han desarrollado estrategias sorprenden-

tes para asegurar la eficiente traducción de sus mRNA, mientras que al mismo tiempo son capaces de regular negativamente la traducción de los mRNA celulares. Las principales etapas en la iniciación de la síntesis de proteínas son blancos comunes de regulación durante las infecciones virales. De hecho, la caracterización de las estrategias virales que son utilizadas para dominar la maquinaria de la síntesis de proteínas de la célula huésped, la optimización de la traducción de los mRNA virales y la evasión de las respuestas anti-virus de la célula, han contribuido en gran medida a entender el proceso de traducción celular y su regulación.

Algunas infecciones virales inducen estrés en el RE porque en el transcurso de la infección las proteínas virales, que se sintetizan en grandes cantidades, se acumulan en este organelo provocando estrés y, por consiguiente, activando la respuesta UPR. En general, existen diversos mecanismos de control de la UPR empleados por los virus, sin embargo todas las estrategias están enfocadas a suprimir los aspectos deletéreos, mientras que mantienen aquellos aspectos que son favorables a su replicación.

Estudios recientes han demostrado que los virus emplean diferentes mecanismos que están enfocados en la regulación de la actividad de PERK y que consisten en interferir la función de esta cinasa. Por ejemplo, el virus de la fiebre africana de los cerdos y el virus de la hepatitis C, inducen UPR durante la infección; sin embargo, previenen la activación de PERK y, por lo tanto, previenen la fosforilación del factor eIF2 y la inhibición global de la síntesis de proteína. Cabe hacer notar que la inhibición de PERK no es la única vía de la UPR regulada por los virus. Durante la infección, el exceso de proteínas virales requiere de proteínas celulares que ayuden a su plegamiento; así, existen virus, como el de la hepatitis C, que inhiben la vía de activación de IRE1 para evitar la degradación de proteínas mal plegadas acumuladas en el RE durante la infección, mientras que favorecen la síntesis de proteínas chaperonas, por medio de la vía ATF6, para ayudar al correcto plegamiento de sus proteínas virales.

Uno de los ejemplos mejor caracterizados es el de citomegalovirus humano (HCMV), el cual durante la infección induce tanto la fosforilación de PERK como la fosforilación de eIF2, que coincide con un aumento en la expresión de ATF4, el cual, a su vez, aumenta la transcripción de genes entre los que se encuentra GADD34. A pesar de la fosforilación de PERK y eIF2 en células infectadas con HCMV, la traducción general no es inhibida. Se desconoce el mecanismo por el cual el HCMV modula la traducción. En cuanto a la activación de ATF6 en células infectadas por HCMV, el nivel del precursor de ATF6 aumenta. No obstante, en células infectadas con HCMV el precursor de ATF6 no es procesado hacia su forma activa. La infección por citomegalovirus también activa la vía de IRE1, indicada por el procesamiento del mRNA de XBP1. Sin embargo, la activación transcripcional de uno de sus genes blanco, EDEM, es inhibida. Estos datos han llevado a proponer que durante la infección por citomegalovirus humano, la UPR es inducida, pero es modificada de tal forma que se favorece la replicación viral, inhibiendo aquellos aspectos que afectan el progreso de la infección viral.

Los rotavirus

Las gastroenteritis infecciosas agudas son la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años en los países en desarrollo, con alrededor de mil millones de episodios diarreicos y entre cuatro y cinco millones de muertes por año. Los rotavirus del grupo A son la causa principal de las diarreas deshidratantes severas en niños menores de dos años, y se ha estimado que una vacuna efectiva contra estos virus podría evitar cerca de 800 000 muertes de infantes cada año. Es importante hacer notar que, aunque la mortalidad debida a las infecciones por rotavirus es mucho mayor en países en desarrollo que en países desarrollados, la frecuencia de infección es muy similar en todo el mundo. Ya que los rotavirus juegan un papel tan importante en las enfermedades diarreicas infantiles, y debi-

do a que incluso niveles de higiene avanzados no son capaces de controlar significativamente las infecciones por estos virus, existe un interés considerable para desarrollar estrategias efectivas de vacunación.

Los rotavirus del grupo A, miembros de la familia *Reoviridae*, son virus no envueltos que tienen aproximadamente 100 nanómetros de diámetro. El virión maduro está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral, el cual consta de once segmentos de RNA de doble cadena (**figura 4**). La capa más interna del virión está formada por 60 dímeros de la proteína VP2, que rodea al genoma viral y a pequeñas cantidades de la RNA polimerasa VP1, y de la guanililtransferasa VP3. VP6, la proteína más abundante del virión, constituye la capa intermedia. La capa más externa está formada por dos proteínas, VP4 y VP7. La superficie lisa del virus está compuesta por la glicoproteína VP7, organizada en forma de trímeros, mientras que 60 espículas, formadas por VP4, se proyectan hacia el exterior de la superficie viral.

En la infección, durante el proceso de entrada a la célula huésped, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa y se activa la transcripción. Los transcritos virales dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VP1-VP6) y seis proteínas no-estructurales (NSP1-NSP6). Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales en el citoplasma celular, de 3 a 4 horas después de iniciada la infección, se forman unas estructuras electrodensas llamadas *viroplasmias*, en donde se ha propuesto que se lleva a cabo la replicación del genoma y también es el lugar en donde se ensamblan las partículas de doble capa para posteriormente gemar al interior del retículo endoplásmico, donde adquieren la tercera capa proteínica, dando lugar a la partícula madura. Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmias, ya que se ha observado que en ausencia de cualquiera de estas dos proteínas no se forman los viroplasmias y el ciclo replicativo del virus se interrumpe.

Poco tiempo después de su entrada, el virus se apodera de la maquinaria de síntesis de pro-

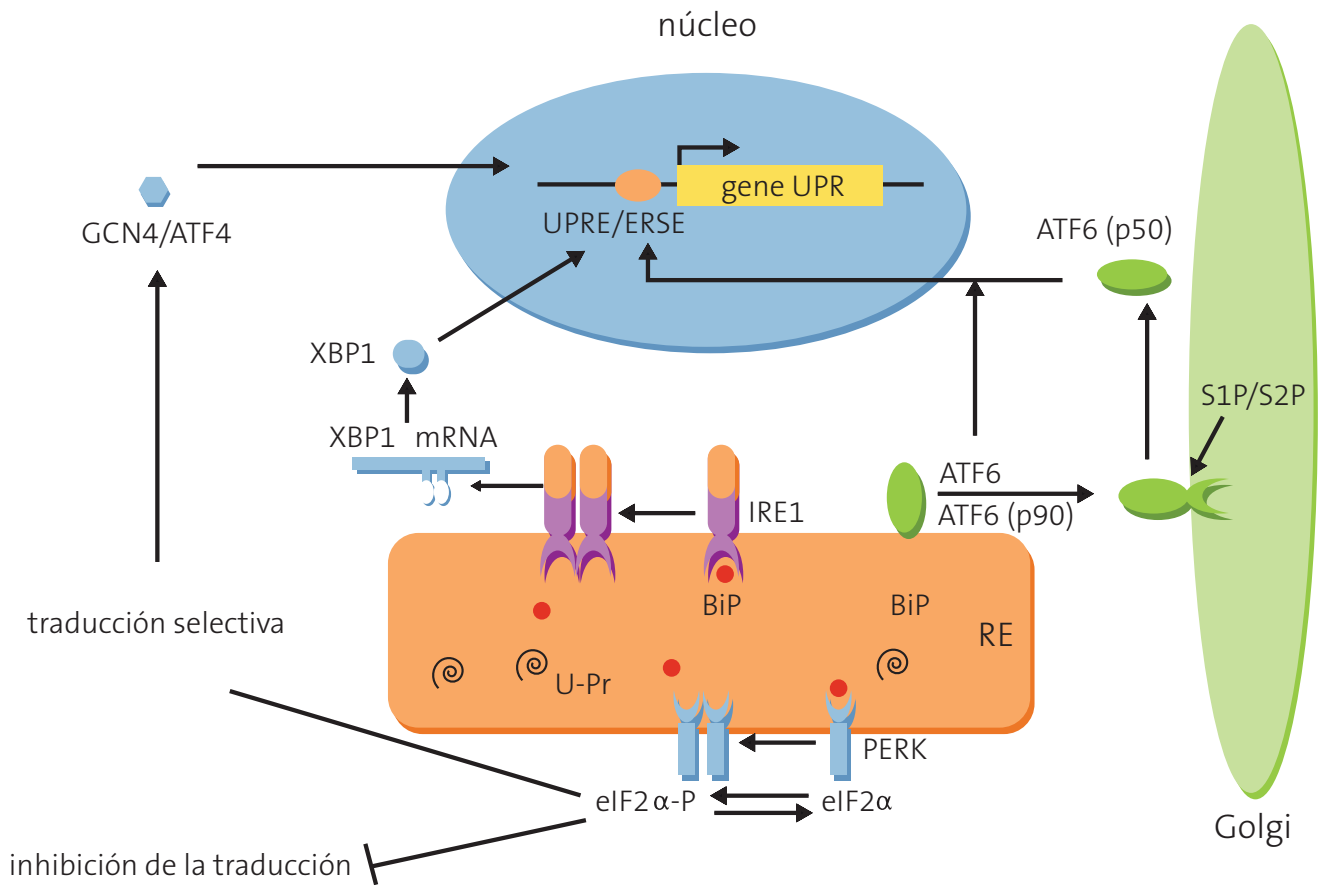


Figura 4.

La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). En el RE se encuentra la proteína chaperona Bip, unida a los tres sensores de la respuesta a estrés (PERK, IRE1 y ATF6). Cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del RE, Bip libera los sensores que se activan y a su vez activan una cascada de señales que inician un programa de transcripción en el núcleo, lo que le permite a la célula responder a las condiciones de estrés y recuperarse.

teínas de la célula, de modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección son las proteínas virales, y la síntesis de proteína celular se ve casi completamente abatida. Recientemente en nuestro laboratorio encontramos que NSP3, que es una proteína no estructural del virus y a la que se le habían atribuido estas funciones, no es necesaria para la traducción de las proteínas virales, aunque sí es importante para abatir la síntesis de proteína celular. Además, encontramos que la inhibición de la síntesis de las proteínas celulares se debe a más de un mecanismo, ya que hemos observado que el factor traduccional eIF2 α se fosforila durante la infección y se mantiene en este estado a lo largo del ciclo replicativo del virus. El hecho de encontrar a este factor fosforilado durante la infección, aunado al hallazgo de que la cantidad de la proteína chaperona BiP en las células aumenta considerablemente, nos ha llevado a proponer que durante la infección por rotavirus se induce una respuesta de UPR, aunque ésta debe de ser modulada de alguna manera para dar lugar a una infección productiva.

Actualmente estamos interesados en demostrar directamente si este es el caso, haciendo ensayos para detectar la activación de los tres sensores de UPR y de sus blancos transcripcionales. Del mismo modo también quisiéramos establecer el mecanismo mediante el cual la UPR puede ser regulada por rotavirus. Uno de nuestros intereses es conocer el mecanismo por el cual eIF2 α se fosforila durante la infección y este estado es mantenido durante el ciclo replicativo del virus. Existen dos posi-

bilidades: la primera es que eIF2 α sea fosforilado por PERK vía UPR o por HRI, GCN2 ó PKR y que la infección con rotavirus propicie un mecanismo que favorezca la constante actividad de alguna de las cuatro cinasas de eIF2 α o bien, que alguna proteína viral interaccione con la proteína GADD34 o con la fosfatasa PP1, con el fin de evitar la actividad de este complejo y favorecer que el factor eIF2 α mantenga su estado fosforilado. Finalmente, estamos interesados en estudiar cómo es que a pesar de que el factor eIF2 α está fosforilado durante la infección, se pueden traducir de manera muy eficiente los mRNA de rotavirus. El estudio de UPR ante la infección por rotavirus nos permitirá aprender acerca de las estrategias que utiliza este virus para interaccionar y controlar a su célula huésped. ●

Bibliografía

- Estes, M. K., "Rotaviruses and their replication", en *Virology* (4a. ed.), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- He, B., "Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses", en *Cell Death Differ*, núm. 13, 2006.
- Montero, H., C. F. Arias y S. López, "Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis", en *J. Virol*, vol. 80, 2006.
- Parashar, U. D. *et al.*, "Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children", en *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, 2003.
- Proud, C. G., "eIF2 and the control of cell physiology", *Semin. Cell Dev. Biol.*, núm. 16, 2005.
- Rutkowski, D. T. y R. J. Kaufman, "A trip to the ER: coping with stress", en *Trends Cell. Biol.*, núm. 14, 2004.
- Schneider, R. J. y I. Mohr, "Translation initiation and viral tricks", en *Trends Biochem. Sci.*, núm. 28, 2003

