

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización de G3BP1 como un nuevo factor de
interacción con el IRES**

Memoria presentada por

Alfonso Galán Casán

Madrid 2016

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Caracterización de G3BP1 como un nuevo factor de
interacción con el IRES**

Memoria presentada por:

Alfonso Galán Casán

Licenciatura en Bioquímica

Directora de Tesis: Encarnación Martínez Salas

Tesis doctoral realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

AGRADECIMIENTOS

Después de un tiempo al fin puedo presentar este trabajo, siempre presentes en mí todas las personas que ya no están entre nosotros pero de las cuales he sentido su aliento en el día a día para animarme. Siempre agradecer a todas las personas de mi alrededor las cuales me han estado dando ánimos todos los días y preguntado sin fin que cuando voy a leer la tesis. Recuerdo momentos críticos donde tuve ese ánimo de mis personas cercanas. Mis padres y a Carlos, sin su ayuda desde mi infancia esto no hubiera sido posible, sus ánimos, su cariño, su dedicación al criarme hasta el día de hoy, todo todo y todo muchísimas gracias. A mi abuela, a todos mis tíos y tías que siempre me preguntaban y me animaban. A mis primos y primas, en especial a los que son como hermanos para mí, Miguelañez, David y Óscar, doblemente especial a mi primo David, siempre estás ahí. A mis amigos, que sin ellos mi mente no hubiera podido evadirse y coger oxígeno, gracias gracias gracias por todos los momentos inolvidables que he pasado con vosotros y vuestro apoyo. Fraguascocoangelmandyalexivanvicentevictortillachimodanipollojavi, no me olvido de una conversación en un momento especial en Vietnam con Nacho viendo a los soldiers, donde tuvo unas palabras clave para que continuara. Gracias a Kathy y a Naira por recibirme en Nepal con los brazos abiertos como uno más, gracias a Mara por el viaje, el tiempo y lo que he aprendido durante y después.

Tengo que hacer una mención especial a una persona muy importante para mí, que me aguanta, me escucha, me entiende, me apoya y está conmigo las 24 horas casi, ANAIS gracias de corazón.

Gracias de corazón a Encarna, sin ella tampoco hubiera sido posible este trabajo, su atención y profesionalidad, su tiempo y su dedicación. Durante el tiempo que he estado en su laboratorio no solo he aprendido en qué consiste la ciencia, sino que ha sido un espejo donde he visto mis virtudes y defectos, y sobre todo son esos defectos los que aún sigo puliendo para mejorar en mi futuro profesional.

Son muy especiales también todas mis compañeras y compañeros de laboratorio, a los cuales durante algún tiempo les he visto más que a mi propia familia. Siempre han sido oídos para escuchar mis penas y alegrías, siempre han sido ojos para ver lo que no veía y siempre han sido una mano extra para ayudarme en todo momento. Ted, Jorge, Charo, Javi, Rosa, Gloria, David, Azman, Noemi, Lisa, Amira y Augusto. No puedo olvidarme de todos los tea time con Ted, de sus clases de Inglés, de su continua alegría y de su amistad. Muchos momentos de té con mi amiga Gloria, mucho oxígeno me has dado también. Ese Jorge siempre animando el labo, imposible que pase desapercibido.

De todo este tiempo, creo que he conocido muchísimas personas en el CBM, desde la -1 hasta la 4. Muchas gracias a todas mis vecinas del 308, nunca he comido solo, en especial a Nuri-nuri por todo el apoyo y su escucha, fundamental. A mis vecinos de planta del 303-304, graaaaaaandes momentos con ellos, cuantas veces me han dado aliento en momentos difíciles, cuantas veces he salido llorando de risa después de verles. Casi era uno más de vosotros. Noe, estés donde estés gracias por muchísimas cosas, los días eran más

fáciles gracias a ti. Jaime muchísimas gracias, como ayudó a mi cabeza prepararme y correr esa media maratón contigo (habrá que echarse algún juego más ¿no?).

A los Bioinformáticos, a los del fútbol, al equipo azul Cesar y Rober, sois muy grandes, a Helena que ya no sé dónde estás. A Ilu, siempre tenía unas palabras agradables.

No puedo olvidarme de la Capoeira, y todas las personas que se han cruzado conmigo desde que empecé hasta hoy. Gracias a Maia, sus consejos me han hecho reflexionar y mejorar como persona, me han ayudado a terminar este trabajo. A Jesús, no hubiera sido posible que continuáramos en Madrid sin ti. A todas mis compañeras y compañeros los cuales he compartido taaaaaaaantos momentos, los cuales gracias a ellos he liberado estrés y he cogido fuerza para continuar el día a día. Javifu por el Shiatsu ¡Gracias!

Gracias a la Universidad, al departamento de Biología molecular, a todos los profesores y profesoras que he tenido en el camino y han plantado semillas, que regándolas han dado sus frutos. Sin la educación, el papel y la paciencia de los profesores, esto no hubiera sido posible.

Gracias a todas y todos

SUMMARY

Characterization of G3BP1 as a novel IRES interacting factor

Internal ribosome entry site (IRES) elements are *cis*-acting RNA regions that were initially characterized in the positive-strand genomic RNA of picornaviruses. IRES elements recruit the translation machinery with the help of IRES *trans*-acting factors (ITAFs). Most ITAFs are RNA binding proteins (RBP) that regulate RNA life span, and form part of macromolecular complexes that determine the fate of mRNA.

Ras-GTPase SH3 domain-binding protein 1 (G3BP1) belongs to a family of RBPs that link tyrosin/kinase receptors-mediated signaling with mRNA metabolism. G3BP1 contains at the C-termini two RNA-binding motifs, a RNA recognition motif (RRM) and an arginine-glycine rich (RGG) motif. G3BP1 is located in stress granules (SGs), and contributes to their assembly. SGs are cytoplasmic aggregates containing stalled pre-initiation complexes, which are thought to serve as sites of mRNA storage during the cell stress response. It has been shown that SGs assembly and function is modulated in picornavirus infected cells likely maximizing viral replication efficiency.

G3BP1 was identified bound to domain 5 (d5) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) IRES through riboproteomic assays. Using RNA electrophoretic mobility shift assays and UV-crosslink we have found that G3BP1 interacts with different domains of the FMDV IRES. Mutational analysis confirmed that the preferential binding site is placed at the single-stranded region of d5. G3BP1 also interacts with the Hepatitis C virus (HCV) IRES. Functional analysis in *in-vivo* and *in-vitro* translation assays using bicistronic and monocistronic RNAs showed that G3BP1 is a translational downregulator of both cap- and IRES-dependent initiation of translation. Pull-down assays demonstrated that G3BP1 interacts with polypyrimidine tract binding protein (PTB) and eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF4B), which are known to stimulate IRES-dependent translation initiation. G3BP1 was proteolized during FMDV infection yielding two fragments, a Ct-G3BP1 fragment harbouring the RRM and RGG motifs and a Nt-G3BP1 fragment. Only the Ct-G3BP1 interacts with PTB and eIF4B. However, both Ct-G3BP1 and the Nt-G3BP1 fragments inhibit cap- and IRES- dependent translation initiation *in vivo* and *in vitro*.

RESUMEN

Caracterización de G3BP1 como un nuevo factor de interacción con el IRES

Los sitios de entrada interna al ribosoma (IRES) son regiones del RNA que actúan *in cis*. Fueron inicialmente caracterizados en el genoma de los picornavirus, y reclutan la maquinaria de traducción con la ayuda de factores de actuación *in trans* del IRES (ITAFs). Los ITAFs son proteínas de unión a RNA (RBP) que forman parte de complejos macromoleculares que determinan el destino del mRNA.

La proteína 1 de unión al dominio SH3 de la GTPasa de Ras (G3BP1) pertenece a una familia de RBPs que acoplan la señalización de receptores asociados a tirosín quinasas con el metabolismo del mRNA. G3BP1 contiene en su extremo C-terminal dos motivos de unión a RNA, un motivo de reconocimiento de RNA (RRM) y un motivo rico en arginina-glicina (RGG). G3BP1 está localizada en gránulos de estrés (SGs) y contribuye a su ensamblaje. Los SGs son agregados citoplásmicos que contienen complejos de pre-iniciación detenidos; se ha propuesto que sirven como depósitos transitorios del mRNA durante la respuesta a estrés. En los últimos años se ha descrito que en células infectadas por picornavirus el ensamblaje y la función de SGs se modula a la vez que aumenta la eficiencia de replicación viral.

G3BP1 se identificó unida al dominio 5 (d5) del IRES del virus de la fiebre aftosa (FMDV) en ensayos de riboproteómica. Utilizando ensayos de movilidad electroforética y de entrecruzamiento por luz UV hemos demostrado que G3BP1 interacciona con distintos dominios del IRES de FMDV. Mediante análisis mutacional se ha confirmado que el sitio preferente de unión se encuentra en la región de cadena sencilla del d5. G3BP1 también interaccionó con el IRES del virus de hepatitis C (HCV). Análisis funcionales de traducción *in vivo* e *in vitro* usando RNAs bi- y mono-cistrónicos han revelado que G3BP1 es un inhibidor de la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap. Ensayos de co-precipitación demostraron que G3BP1 puede interaccionar con la proteína de unión al tramo de polipirimidinas (PTB) y con el factor de inicio de la traducción eucariótico 4B (eIF4B) de manera directa. Ambas proteínas son estimuladoras de la traducción dependiente de IRES. G3BP1 se proteoliza durante la infección por FMDV, originando un fragmento carboxilo-terminal (Ct) que presenta los motivos de unión a RNA y otro, amino-terminal (Nt). Solamente el fragmento Ct-G3BP1 interacciona de manera directa con las proteínas PTB y eIF4B. Sin embargo ambos fragmentos muestran la capacidad de inhibir la traducción dependiente de IRES y de cap, tanto *in vivo* como *in vitro*.

ÍNDICE

SUMMARY	7
RESUMEN	9
ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	19
1. INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS	21
1.1 Iniciación de la traducción dependiente de cap	21
a. Ensamblaje del complejo de preiniciación 43S	21
b. Unión del complejo 43S al mRNA y rastreo de la región 5'NTR	24
c. Reconocimiento del codón de inicio y unión de la subunidad 60S	25
1.2 Inicio de la traducción dependiente de IRES	26
a. IRES de picornavirus	27
b. IRES del virus de la hepatitis C	30
2 REGULACIÓN DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS	31
2.1 Regulación de la traducción por modificaciones de los factores de inicio de la traducción	31
2.2 Regulación de la traducción por estrés celular	33
a. Gránulos de estrés	34
b. Gránulos de estrés en infecciones virales	35

3. LA PROTEÍNA G3BP1	36
3.1. Localización subcelular de G3BP1	39
3.2. G3BP1 es un componente de varios mRNPs	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. PLÁSMIDOS	47
1.1. Vectores de expresión de los dominios del IRES	47
1.2. Plásmidos de expresión de proteínas	47
2. BACTERIAS	50
3. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO	51
4. TRADUCCIÓN IN VITRO	51
5. LINEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO	52
6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES S10	52
7. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS PURIFICADAS	53
7.1. Expresión y purificación de G3BP1	53
7.2. Expresión y purificación de GST-G3BP1	54
7.3. Purificación de PTB y eIF4B	54
8. ENSAYOS DE INTERACCIÓN RNA-PROTEÍNA	55
8.1. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética	55

8.2	Ensayos de entrecruzamiento con luz UV	55
9.	ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	56
10.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD	56
11.	WESTERN BLOT	56
12.	ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA	57
13.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	58
	RESULTADOS	59
1	Identificación del sitio preferente de unión de G3BP1 al IRES de FMDV	61
1.1	Caracterización del sitio preferente de unión de G3BP1 al dominio 5 del IRES de FMDV	65
2	G3BP1 es un inhibidor de la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap	68
2.1	G3BP1 es un inhibidor de la traducción in vitro	68
2.2	G3BP1 es un inhibidor de la traducción en células en cultivo	73
3	G3BP1 interacciona directamente con PTB y eIF4B	73
3.1	G3BP1 interacciona directamente con PTB	74
3.2	G3BP1 interacciona directamente con eIF4B	75
4	G3BP1 interacciona con RBPs en extractos de HEK293	76
5	Entrecruzamiento de G3BP1 mediante luz UV al IRES de FMDV	77

5.1	G3BP1 se entrecruza al dominio 5 del IRES de FMDV	77
5.2	G3BP1 desplaza a PTB de su sitio de unión al IRES de FMDV	78
6	La proteasa 3C proteoliza G3BP1	79
7	El fragmento amino terminal y carboxilo terminal de G3BP1 inhiben la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap	80
7.1	Los fragmentos Nt y Ct de G3BP1 son inhibidores de la traducción in vitro	80
7.2	Los fragmentos Nt y Ct de G3BP1 son inhibidores de la traducción in vivo	82
8	El fragmento Ct-G3BP1 interacciona directamente con PTB y eIF4B	83
DISCUSIÓN		87
1.	La interacción de G3BP1 con el IRES permite flexibilidad de secuencia	89
2.	G3BP1 desplaza a PTB de su sitio de unión al IRES de FMDV	92
3.	G3BP1 es un represor de la traducción	93
4.	G3BP1 es proteolizada en células infectadas por picornavirus	96
CONCLUSIONES		99
BIBLIOGRAFÍA		101

ABREVIATURAS

3C^{pro}	Proteasa 3C
4E-BP	Del inglés, 4E-binding protein, proteína de unión a 4E
ABCE1	Del inglés, ATP-binding cassette E1
AUGi	AUG iniciador
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
eEF	Factor de elongación eucariota
eIF	Factor de iniciación eucariota
EMCV	Virus de la encéfalomiocarditis
FMDV	Del inglés, foot-and-mouth disease virus, virus de la fiebre aftosa
G3BP	Del inglés, Ras-GTPase activating protein SH3 domain binding protein, proteína de unión al dominio SH3 de la GTPasa activadora de Ras
GST	Del inglés, Glutathione S-transferase, Glutación S-transferasa
HCV	Virus de la hepatitis C
hnRNPs	Del inglés, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, ribonucleoproteínas nucleares heterogeneas
hpi	Horas post-infección
IRES	Del inglés, Internal ribosome entry site, sitio de entrada interna del ribosoma
ITAF	Del inglés, IRES <i>trans</i> acting factor, factor transactivador del IRES
Kb	Kilobase
Lb	Proteasa Lb de FMDV
Luc	Luciferasa
MFC	Del inglés, Multi factor complex, complejo multi factor
Met-tRNAi	tRNA iniciador cargado con Metionina
NTR	Región no traducida
ORF	Del inglés, open reading frame, zona codificante
PABP	Del inglés, poly(A) binding protein, protein de unión a poli(A)
PIC	Del inglés, pre-initiation complex, complejo de preiniciación
PCBP	Del inglés, poly (C) binding protein, proteína de unión a poli(C)
PTB	Del inglés, polypyrimidine tract binding protein, protein de unión al tramo de polipirimidinas
PV	Virus de la Polio
RBP	Del inglés, RNA binding protein, proteína de unión a RNA

REMSA	Del inglés, RNA electrophoretic mobility shift assay, ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética de RNA
RNAc	RNA citoplásmico
RNP	Del inglés, ribonucleoprotein, ribonucleoproteína
RRL	Del inglés, rabbit reticulocyte system, sistema de lisado de reticulocitos
RRM	Del inglés, RNA recognition motif, motivo de reconocimiento de RNA
SD	Del inglés, standard deviation, desviación estándar de la media
SDS-PAGE	Del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico
SGs	Del inglés, stress granules, gránulos de estrés
SVDV	Virus de la enfermedad vesicular del cerdo
UV-XL	Ensayo de entrecruzamiento con luz UV
vTF7-3	Virus de la vacuna que expresa la RNA polimerasa del fago T7
WB	Western blot

INTRODUCCIÓN

1. INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS

La transcripción de numerosos genes produce moléculas de RNA mensajero (mRNA) que, a su vez, codifican proteínas mediante el proceso denominado traducción. El mRNA posee una zona codificante (ORF) y dos regiones flanqueantes que no se traducen (NTR). La ORF de un RNA mensajero comienza por el codón de iniciación (generalmente AUG), y termina por uno de los tres codones de parada, UAA, UAG o UGA. Por otra parte, las regiones no traducidas poseen la mayor parte de los elementos reguladores de la traducción (Wilkie et al, 2003).

La traducción es un proceso cíclico que consta de varias fases, iniciación, elongación, terminación y reciclaje del ribosoma. En el proceso de traducción participan numerosas proteínas y RNAs de distinta naturaleza (Hinnebusch, 2011; Jackson et al, 2010). Entre las proteínas destacan los factores de inicio de la traducción (eIFs) 1-6 y factores de elongación (eEFs), mientras que entre los RNAs destacan el mRNA, el RNA ribosómico (rRNA) y el RNA transferente (tRNA).

1.1 Iniciación de la traducción dependiente de cap

La regulación de la traducción se ejerce fundamentalmente en la fase de iniciación. Básicamente la iniciación de la traducción comprende 3 pasos. 1) Ensamblaje del complejo de pre-iniciación 43S, 2) Unión del complejo 43S al RNA y escaneo de la 5'NTR hasta el reconocimiento del AUG iniciador, y 3) Unión de la subunidad mayor del ribosoma 60S (Figura 1).

a) Ensamblaje del complejo de preiniciación 43S

Las subunidades 40S (40S) del ribosoma necesarias para el inicio de la traducción derivan del reciclaje de los complejos de post-terminación de la traducción. A baja concentración de magnesio (1 mM) el reciclaje está mediado por eIF3, eIF1 y eIF1A. Todos ellos separan la subunidad 60S (60S) de la 40S unida al mRNA y al tRNA. eIF1 promueve la separación del tRNA de 40S, mientras que eIF3 se une a la subunidad 40S con cooperatividad

negativa para el mRNA, separándolo finalmente de la subunidad 40S. Estos factores permanecen asociados a la subunidad 40S para prevenir la reasociación con la subunidad 60S. A altas concentraciones de magnesio (2,5 mM), que estabilizan la unión entre las subunidades ribosomales, se requiere la acción de la familia de proteínas ATP-binding cassette E (ABCE1) para promover la separación de 60S y 40S (Pisarev et al, 2010).

El complejo ternario (TC) formado por eIF2-GTP-Met-tRNA_{Met} se une al complejo 40S-eIF3-eIF1-eIF1A-eIF5 dando lugar el complejo de preiniciación (PIC) 43S (Figura 1). La interacción entre eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 estabiliza la unión del TC a la subunidad 40S del ribosoma.

eIF3 es un complejo formado por múltiples subunidades según la especie (5 en levaduras, 13 en humanos). Posee la capacidad de unirse por separado a cualquiera de los componentes del PIC, siendo sumamente importante para coordinar su ensamblaje (Asano et al, 2000; Kolupaeva et al, 2005). eIF3, junto con eIF1, eIF5 y el TC, forman el complejo multifactor (MFC) en ausencia de ribosomas *in vivo* e *in vitro* (Asano et al, 2000). Existen dos hipótesis sobre la función del MFC. Una de ellas es que es importante para el ensamblaje del PIC en levaduras, aunque aún no hay evidencia de si estas interacciones ocurren en el contexto de ensamblaje del PIC o si el ensamblaje del PIC ocurre por distintos mecanismos en presencia del MFC (Jivotovskaya et al, 2006; Singh et al, 2004; Valasek et al, 2002). Otra hipótesis es que el MFC sirve como depósito, almacenando componentes críticos para el inicio de la traducción, y así prevenir que el ribosoma interactúe con eIFs errantes en el citoplasma después de cada ronda de traducción (Aitken & Lorsch, 2012).

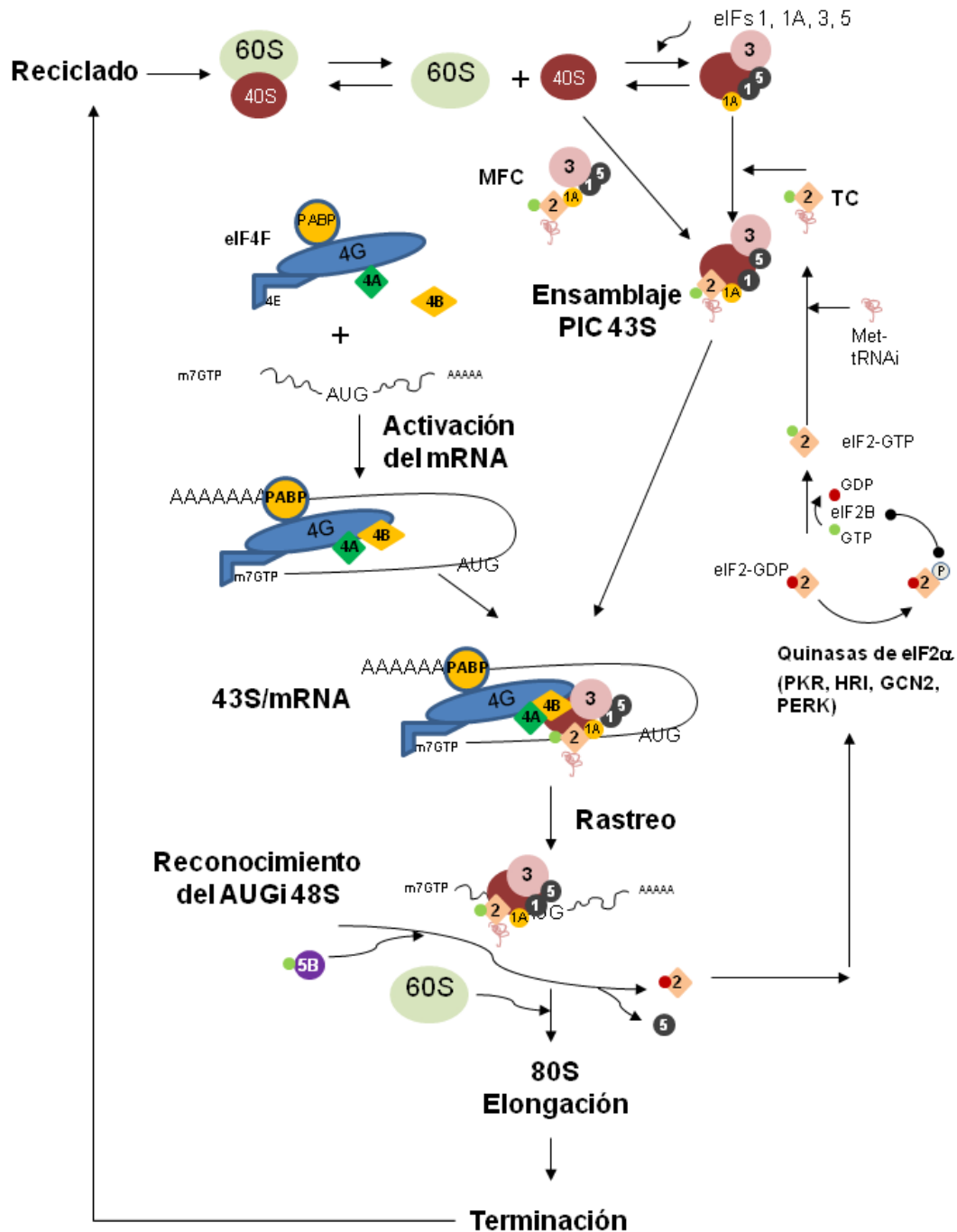


Figura 1. Esquema del proceso de traducción dependiente de cap. Adaptado de Hinnebusch, 2011. El proceso de traducción es discutido en el texto.

b) Unión del complejo 43S al mRNA y rastreo de la región 5'NTR

Una vez formado el complejo 43S, éste recluta al mRNA (previamente unido a eIF4F y a la proteína de unión a poli(A) (PABP) rastreando la región 5'NTR del mRNA hasta encontrar el codón de inicio, para formar el complejo 48S.

El primer paso del inicio de la traducción es la unión del complejo eIF4F y PABP al mRNA. El complejo eIF4F está formado por eIF4E, eIF4G, eIF4A y eIF4B. El extremo 5' m⁷GTP (o cap) del mRNA, es reconocido por eIF4E, que a su vez, está unido a eIF4G. eIF4G tiene sitios de interacción con RNA y con otras proteínas como eIF4A, eIF3, PABP. Una vez eIF4G está unido al mRNA, la helicasa eIF4A ayudada de eIF4B es responsable del desenrollamiento de la región 5'NTR del mRNA. eIF4G también interacciona con PABP acercando los extremos 5' y 3' del mRNA formando una estructura pseudocircular que permite que los procesos de terminación, reciclaje e iniciación se acoplen, favoreciendo sucesivas rondas de traducción del mismo mRNA.

En los últimos años se ha comprobado que el mRNA está unido al complejo eIF4F por una red de interacciones redundantes, lo que previene que la traducción se detenga a causa del desacoplamiento de uno o más miembros del complejo. Por ejemplo, eIF4E no es imprescindible para la interacción de eIF4F con el mRNA, debido a los múltiples sitios de unión de eIF4G al mRNA (Kaye et al, 2009). Igualmente, el efecto de la interacción PABP-eIF4G es modesto *in vitro* y parece ser más importante en situaciones de competición en presencia de otras proteínas de unión al RNA (Svitkin et al, 2009).

Como se ha dicho anteriormente, es importante desenrollar la estructura de la región 5'NTR del mRNA para la llegada del complejo 43S y la subsiguiente formación del complejo 48S. La actividad helicasa de eIF4A es estimulada por eIF4B o su homólogo eIF4H (Liu et al, 2008; Lorsch & Herschlag, 1998). La interacción de eIF4G con eIF4A posiciona a esta proteína para que ejerza su actividad helicasa dependiente de ATP (Marintchev et al, 2009; Oberer et al, 2005). Recientemente se ha descrito que la proteína DHX29 es necesaria para escanear las regiones 5'NTRs muy estructuradas. Esta helicasa se une a la subunidad 40S, pudiendo influenciar la conformación del canal de entrada del mRNA facilitando el rastreo (Pisareva et al, 2008). Estas observaciones sugieren que la helicasa eIF4A contribuye al reclutamiento local del complejo 43S, desestructurando localmente la región próxima al cap, mientras que otras helicinas como DHX29 desenrollan regiones altamente estructuradas durante el rastreo.

El mecanismo por el cual el PIC 43S se une al mRNA aún no está claro. Sin embargo, las interacciones entre el PIC y el complejo eIF4F ayudan a entender este proceso. El complejo eIF3 se une directamente a la subunidad 40S (Hinnebusch, 2006; Kolupaeva et al,

2005; Valasek et al, 2003). Su depleción en levaduras reduce notablemente el reclutamiento del mRNA, mientras que la depleción de eIF4G ejerce un efecto modesto sobre los niveles de reclutamiento del PIC al mRNA (Mitchell et al, 2010). Por otra parte, se han descubierto mutaciones en eIF3 que afectan a la unión del PIC y el mRNA *in vivo* (Chiu et al, 2010; Marintchev et al, 2009; Mitchell et al, 2010).

Una vez el complejo 43S está acoplado al mRNA, se produce el rastreo de la 5'NTR hasta reconocer el AUG iniciador en un contexto adecuado (Kozak, 1989). La dirección de rastreo es 5'-3'. En general, los elementos que gobiernan la eficiencia del reconocimiento del AUG iniciador (AUGi) se encuentran en 5' respecto al codón de inicio, existiendo una relación inversa entre la longitud de la región 5'NTR y el nivel de inicio de la traducción en extractos celulares (Martin-Marcos et al, 2011; Pisarev et al, 2006).

El rastreo consiste básicamente en dos procesos asociados, el desenrollamiento de la estructura secundaria de la región 5'NTR y el movimiento del ribosoma a través de esta. Existen varios modelos de cómo se produce el rastreo. En uno de ellos, eIF4B sirve como freno uniéndose al RNA de cadena sencilla (RNAss) detrás del complejo de rastreo del mRNA (formado en su mayoría por proteínas que forman parte del PIC), previniendo que retroceda (Spirin, 2009). En otro modelo, eIF4A y eIF4B desenrollan el mRNA a medida que el complejo de rastreo avanza, mientras que las estructuras se forman de nuevo una vez ha pasado actuando como freno (Marintchev et al, 2009). Ambos modelos apoyan el hecho de que los frenos imponen que el complejo rastree en la dirección 5'-3' y previenen que éste retroceda.

c) Reconocimiento del codón de inicio y unión de la subunidad 60S

Para asegurar la fidelidad del inicio de traducción, los complejos que realizan el rastreo utilizan un mecanismo para discriminar codones distintos de AUGs, o AUGs que no están en el contexto adecuado, promoviendo el reconocimiento del codón de inicio AUG. Normalmente, éste es el primer AUG que se encuentra emplazado en un contexto que incluye una purina en la posición -3 y una G en la posición +4 (relativos a la A del AUG, que se designa como +1) (Kozak, 1987).

Estudios genéticos en levaduras desvelaron el papel crítico que desempeña eIF1 durante este proceso. La disociación de eIF1 una vez se reconoce el AUGi produce una serie de

cambios estructurales en el complejo de rastreo que provocan una conformación cerrada del complejo 48S (Algire et al, 2005; Maag et al, 2005). Estos cambios liberan Pi de eIF2 y desplazan eIF1A emplazado cerca del sitio P del ribosoma, facilitando el acomodamiento definitivo del tRNA_i en el sitio P del ribosoma. Otro factor que juega un papel importante es eIF5. eIF5 se une a la subunidad β de eIF2 e induce la actividad GTPasa de esta última. La sobreexpresión de eIF5 disminuye la fidelidad del reconocimiento del AUG iniciador, un efecto que se contrarresta con la sobreexpresión de eIF1 (Loughran et al, 2012).

Una vez el tRNA_i está acomodado en el sitio P del ribosoma y el complejo de rastreo está en la conformación cerrada, los factores eIF1A, eIF2-GDP y eIF5 deben dissociarse del complejo 48S antes de que la subunidad 60S pueda unirse. En este proceso interviene eIF5B. Primero se libera eIF1A cuando eIF5B-GTP se une al complejo 48S en conformación cerrada; a continuación se liberan los factores eIF2-GDP y eIF5. En el momento que se hidroliza el GTP unido a eIF5B se produce la liberación de este factor, dejando la subunidad 60S del ribosoma preparada para unirse a la subunidad 40S dando lugar a la formación del complejo 80S, competente para comenzar la fase de elongación de la traducción (Acker et al, 2009; Marintchev et al, 2003; Shin et al, 2002). eIF3 permanece unido a la subunidad 40S y participa en los eventos de reciclaje del ribosoma (Pöyry et al, 2007; Szamecz et al, 2008).

1.2 Inicio de la traducción dependiente de IRES

El inicio de la traducción puede ocurrir mediante un mecanismo alternativo, promovido por los sitios de entrada interna del ribosoma (IRES). Este mecanismo fue descubierto hace 27 años en el genoma de los picornavirus (Jang et al, 1988; Pelletier & Sonenberg, 1988). Posteriormente se ha descrito en otros RNAs virales y en algunos mRNAs celulares. Los elementos IRES son secuencias del RNA que actúan *in vivo*, forman estructuras secundarias y terciarias, y facilitan el reclutamiento de la maquinaria traduccional, posicionándola directamente cerca del codón de inicio. Por ello, la iniciación interna es independiente del reconocimiento del cap. En el caso de mRNAs celulares este tipo de iniciación sucede cuando el inicio de traducción dependiente de cap está severamente afectado, como en el caso de privación de aminoácidos, estrés celular, choque térmico o infecciones víricas (Spriggs et al, 2010; Walsh & Mohr, 2011). En el caso de algunos virus RNA el inicio de la traducción se lleva a cabo enteramente mediante este proceso.

Los elementos IRES descritos hasta hoy no muestran conservación de estructura primaria, de estructura secundaria ni de requerimientos de los factores proteicos para su función. La clasificación de los diversos IRES descritos se realiza en función de su origen, estructura y de los factores necesarios para su función (Martínez-Salas et al, 2015). Pueden distinguirse dos grupos principales, IRES celulares o IRES virales. El último, a su vez, engloba cuatro grupos. 1) IRES de picornavirus; 2) IRES de hepacivirus y pestivirus; 3) IRES de lentivirus y 4) IRES de dicistrovirus. Los distintos tipos de IRES utilizan estrategias diferentes para el inicio de la traducción.

a) IRES de picornavirus

Los picornavirus poseen una región 5'NTR larga y fuertemente estructurada que incluye varios elementos implicados en la replicación viral, entre los que se encuentra el IRES (Fernández-Miragall et al, 2009). Aunque menos del 50% de la secuencia primaria está conservada entre los IRES de picornavirus, la similitud de su estructura permite la clasificación en 4 tipos diferentes: Tipo I) Enterovirus (Poliovirus (PV), Rinovirus humano (HRV); Tipo II) Virus de la encéfalomiocarditis (EMCV) y Virus de la fiebre aftosa (FMDV); Tipo III) Virus de la hepatitis A (HAV); Tipo IV) Tesco virus porcino (PTV) (Figura 2).

La iniciación de la traducción en el RNA de los picornavirus depende del elemento IRES localizado en la región 5'NTR de su genoma. La región IRES comprende alrededor de 450 nucleótidos localizados por delante del triplete de inicio de la poliproteína. En el caso de FMDV, el elemento IRES se estructura en 5 dominios, denominados 1-5 (Lozano & Martínez-Salas, 2015). La actividad IRES depende tanto de la estructura como de las interacciones RNA-proteína con factores celulares (Belsham et al, 2000; Martínez-Salas, 2008). El estudio de la covariación en secuencias de aislados de campo y el análisis mutacional del IRES han aportado pruebas de la importancia de la estructura del IRES para su actividad (Fernández-Miragall & Martínez-Salas, 2003; Fernández-Miragall et al, 2006; Fernández et al, 2013; Fernández et al, 2011).

La iniciación interna de la traducción depende del reconocimiento del IRES por varias proteínas celulares. Los componentes mínimos necesarios para ensamblar el complejo 48S *in vitro* en ensayos de reconstitución para IRES de tipo I y II son la subunidad 40S, eIF2-GTP-Met, eIF4G, eIF4A, eIF3 y ATP (Figura 3) (Andreev et al, 2007; de Breyne et al,

2009), siendo estimulada por la PTB (del inglés polypirimidine tract binding protein) y Ebp1 (del inglés ErbB3 binding protein 1) en FMDV y EMCV (Andreev et al, 2007; Yu et al, 2011), y PCBP2 (del inglés poly(C) binding protein 2) en enterovirus (Sweeney et al, 2014).

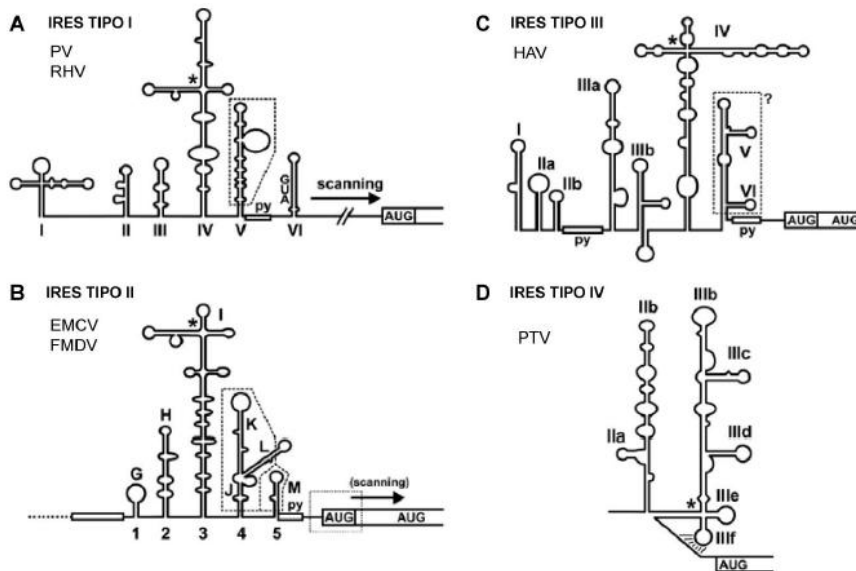


Figura 2. Tipos de IRES del género picornavirus. (Adaptado de Niepmann, 2009). Los IRES de tipo I incluyen al Poliovirus y al Rinovirus humano. Los IRES tipo II incluyen al virus de fiebre aftosa y virus de la encefalomiocarditis. Los IRES de tipo III incluyen al virus de la hepatitis A y los IRES de tipo IV al tesco virus porcino.

En el caso del IRES de FMDV, el dominio 4-5 presenta el sitio de unión para eIF4G, eIF4B y eIF3 (Lopez de Quinto et al, 2001; Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000). Sin embargo, la interacción de estas proteínas no es suficiente para que la actividad IRES sea eficiente, lo que pone en evidencia la importancia de los dominios 2 y 3 para que el IRES funcione correctamente (Fernandez-Miragall et al, 2009). La reconstitución de complejos 48S en IRES de tipo IV incluyen la subunidad 40S, eIF2-GTP-Met, y eIF3 (Pisarev et al, 2004), recordando el modo que utiliza el IRES de HCV de iniciar la traducción (Pestova et al, 1998). La información disponible sobre el requerimiento de factores para los IRES de tipo III es escasa todavía.

Los RNAs de picornavirus también difieren entre sí en su funcionamiento en lisados de reticulocitos de conejo (RRL) y en el tipo celular donde se expresen. De este modo, el RNA de PV no se traduce en RRL hasta que no se suplementa el medio con extracto de

células HeLa (Dorner et al, 1984). La diferencia entre distintos IRES radica en el requerimiento de proteínas ausentes en RRL, o bien, presentes en cantidades limitantes. Así fue como se descubrieron los factores auxiliares del IRES llamados ITAFs (Gebhard & Ehrenfeld, 1992). La mayoría de los ITAFs son RBPs con dominios de unión a RNA organizados de manera modular. A menudo estas proteínas han sido identificadas como factores implicados en la maquinaria de splicing, reguladores de la transcripción, reguladores del transporte de RNA etc, lo que demuestra que existe una compleja red de interacciones que regula la expresión génica (Lukong et al, 2008; Lunde et al, 2007). Sin embargo, el requerimiento de ITAFs es diferente dependiendo del IRES en cuestión y algunas proteínas presentan unos requerimientos más estrictos que otras (Francisco-Velilla et al, 2015; Kim & Jang, 1999; Yu et al, 2011).

El primer ITAF identificado fue PTB (Jang & Wimmer, 1990; Luz & Beck, 1991). En la célula se expresan diversas isoformas de PTB, todas ellas poseen 4 motivos de reconocimiento de RNA (RRM) que interaccionan con secuencias ricas en U/C (Monie et al, 2007). Los IRES de picornavirus presentan más de un tramo de polipirimidinas (Fernandez-Miragall et al, 2009). Diversos estudios han demostrado que PTB estabiliza la estructura del RNA actuando como una chaperona. En EMCV, los RRM 3-4 de PTB se unen al dominio 2 y a la región 3' del IRES orientando su estructura en el espacio (Kafasla et al, 2009).

Los ITAFs actúan en combinación para ejercer el control de la actividad IRES. Como hemos mencionado, PTB y Ebp1 estimulan la actividad del IRES de FMDV. Sin embargo, la depleción de Ebp1 no causó ningún efecto en un IRES del mismo tipo como EMCV (Monie et al, 2007). Los avances en riboproteómica han permitido conocer en más detalle ITAFs unidos a determinados IRES (Pacheco & Martinez-Salas, 2010). Algunas proteínas identificadas mediante este método (Pacheco et al, 2008) se sabía previamente que se unen al IRES mediante otros abordajes (REMSA, UV-crosslink o RNA footprint), como es el caso de eIF4B, eIF3 o PTB (Lopez de Quinto et al, 2001; Luz & Beck, 1991).

b) IRES del virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) pertenece al género hepacivirus de la familia *flaviviridae*. El inicio de la traducción de su RNA genómico también se regula por un elemento IRES. El elemento IRES de HCV consta de 340 nucleótidos, distribuidos en dominios denominados

II, III y IV (Berry et al, 2011b). Estudios mutacionales realizados en el IRES de HCV demostraron que es necesaria la integridad estructural del RNA para la síntesis eficiente de proteínas tanto *in vivo* como *in vitro* (Rijnbrand et al, 2004). Estos elementos demuestran la importancia de la estructura del IRES para llevar a cabo su función.

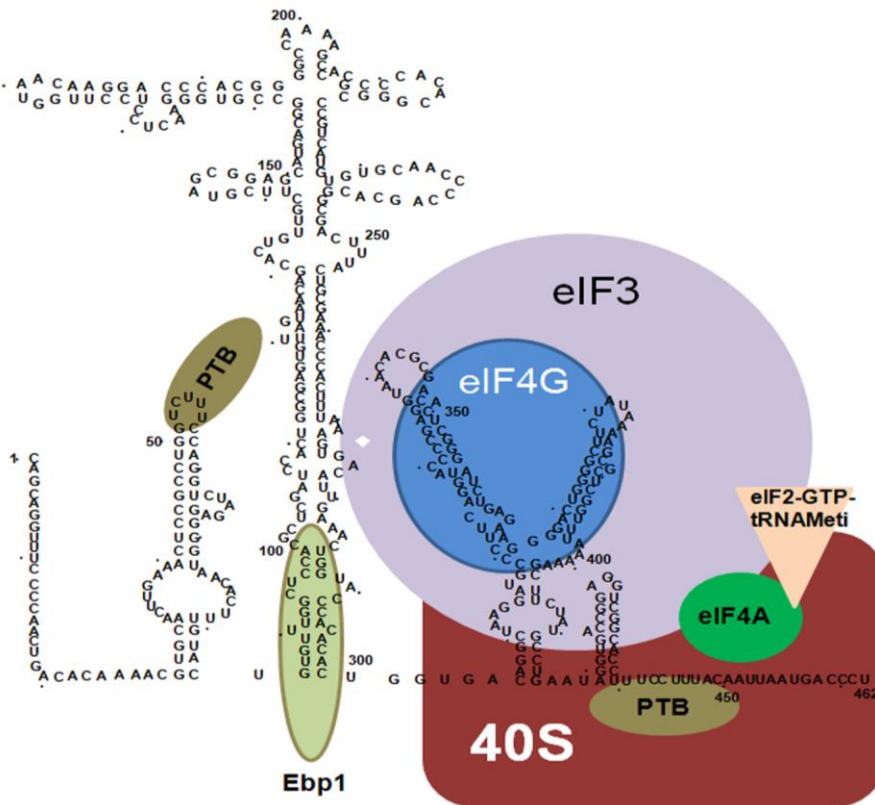


Figura 3. Factores requeridos para el inicio de la traducción dirigida por el IRES de FMDV. Las proteínas representadas en la figura son los factores mínimos necesarios para el inicio de la traducción del IRES de FMDV y los ITAFs PTB y Ebp1 estimulantes del inicio de la traducción.

Aunque la flexibilidad del RNA ha complicado la resolución de su estructura mediante abordajes cristalográficos, se ha podido obtener la estructura a resolución atómica de algunos subdominios (Kieft et al, 2002; Lukavsky et al, 2000) y más recientemente, del IRES completo en solución (Perard et al, 2013). Estos estudios han revelado que los dominios del IRES pueden plegarse de manera independiente. Los subdominios III a,b,c son necesarios para la unión de eIF3 y la subunidad 40S. La interacción del eIF3 con el IRES de HCV se analizó mediante Cryo-EM (Siridechadilok et al, 2005), en condiciones de inactivación de eIF2. En este caso, eIF3 junto con eIF5B puede formar un complejo de

preiniciación que recuerda al modo de iniciación en bacterias (Berry et al, 2011a; Terenin et al, 2008). Más recientemente, se ha obtenido la estructura del IRES de HCV y otros HCV-like acomplejados a subunidades 80S (Filbin et al, 2013; Hashem et al, 2013).

2. REGULACIÓN DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS

2.1 Regulación de la traducción por modificaciones de los factores de inicio de la traducción

Los factores eIF2 y eIF4F juegan un papel clave en la regulación de la síntesis de proteínas. La formación del complejo ternario está regulada por eIF2. Este factor está compuesto por tres subunidades (α , β , γ). La subunidad γ es responsable de la unión a GTP y al Met-tRNA_i para formar el complejo ternario y posee actividad GTPasa intrínseca (Kapp & Lorsch, 2004); eIF2 β regula la unión al tRNA_i; eIF2 α regula su actividad por fosforilación del residuo Ser51. Si este residuo está fosforilado, aumenta la afinidad por eIF2B, lo que conduce al mantenimiento del complejo eIF2 α -GDP-eIF2B, inhibiendo la iniciación de la traducción (Hinnebusch, 2014). eIF2B es un factor escaso en el citoplasma. Por tanto, a bajos niveles de fosforilación de eIF2 α , eIF2B se secuestra eficazmente.

En mamíferos la fosforilación de eIF2 depende de 4 quinasas específicas (Figura 1). La proteína quinasa R (PKR) se activa por RNA de doble cadena generado durante la replicación de muchos virus, choque térmico e irradiación con UV (Srivastava et al, 1998). El inhibidor regulado por heminas (HRI) se activa por niveles bajos de hierro durante la maduración de eritrocitos (McEwen et al, 2005). La proteína quinasa regulada por estrés de retículo endoplasmático (PERK) se estimula en presencia de proteínas mal plegadas (Harding et al, 2000a; Harding et al, 2000b). La proteína GCN2 (del inglés, General control nonderepressible) se activa en respuesta a niveles bajos de aminoácidos (Wek et al, 1995). Todas ellas se caracterizan por tener un mismo dominio catalítico con distintos dominios reguladores.

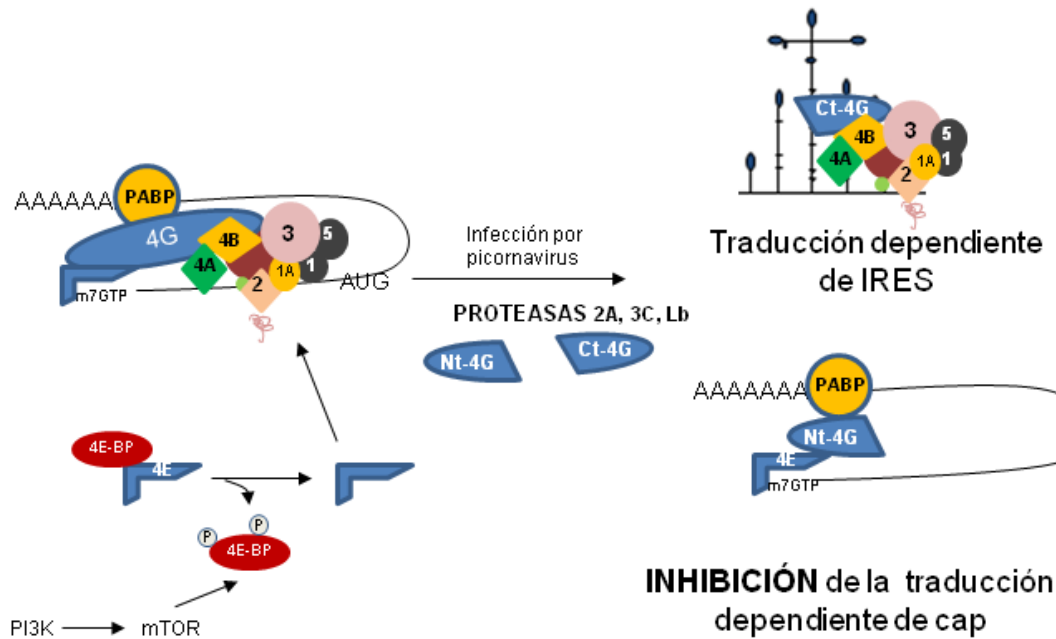


Figura 4. Representación esquemática de la regulación de la traducción por las proteasas de picornavirus y la fosforilación de 4E-BPs. La infección causada por picornavirus produce una rápida hidrólisis del factor eIF4G por acción de la proteasas 2A, Lb o 3C. El corte de eIF4G inhibe la traducción cap-dependiente y favorece la traducción de los IRES virales. Otros picornavirus, como el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) inhiben la traducción cap-dependiente induciendo la defosforilación de las proteínas de unión a 4E (4E-BPs). Las 4E-BPs se unen al factor eIF4E desplazando al factor eIF4G.

Otro punto importante en la regulación de la traducción depende de eIF4G. La composición del complejo eIF4F es regulado por las proteínas 4E-BPs que compiten con eIF4G por su unión a eIF4E (Dever, 2002). Estados hipofosforilados de 4E-BPs interaccionan con eIF4E, afectado así la unión de eIF4G y la traducción dependiente de cap (Figura 4) (Marcotrigiano et al, 1999). La fosforilación de 4E-BPs es controlada por la quinasa PI3K (Gingras et al, 1996), entre otras.

El genoma de los picornavirus no codifica ningún componente de la maquinaria traduccional. Para completar su replicación hace uso de la maquinaria celular, en detrimento de la síntesis de proteínas de la propia célula. Normalmente las infecciones virales desencadenan una serie de respuestas en la célula, por las que la traducción dependiente de cap resulta afectada o inhibida. La proteólisis de eIF4G se produce por la proteasa 2A de poliovirus, y por la proteasa Lb de FMDV (Figura 4), generando dos fragmentos. El extremo N-terminal posee los sitios de unión de eIF4E y PABP (Imataka et

al, 1998), mientras que el extremo C-terminal contiene los sitios de unión a eIF4A, eIF3, el motivo de reconocimiento de RNA y el sitio de interacción con la quinasa Mnk1 (Goyer et al, 1993; Imataka & Sonenberg, 1997; Lamphear et al, 1995). La separación de estos dos extremos tiene como consecuencia la inhibición de la traducción dependiente de cap, ya que el reconocimiento del mRNA por parte del extremo C-terminal es insuficiente en ausencia de eIF4E unido al cap (Kahvejian et al, 2005). Sin embargo, el fragmento C-terminal promueve la actividad IRES de diversos picornavirus (Kolupaeva et al, 1998; Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000; Ohlmann et al, 1996; Pilipenko et al, 2000; Pilipenko et al, 2001).

PABP también es un factor sujeto a proteólisis en células infectadas por PV, por las proteasas 2A y 3C (Joachims et al, 1999) y por L en células infectadas por FMDV (Rodriguez-Pulido et al, 2007). Como consecuencia, PABP deja de interactuar con eIF4G, afectando la traducción dependiente de cap (Joachims et al, 1999).

2.2 Regulación de la traducción por estrés celular

La regulación post-transcripcional de la expresión génica es crucial para el desarrollo, la diferenciación celular, la plasticidad neuronal o durante la respuesta a diversas situaciones de estrés celular como el choque térmico, el estrés oxidativo, infecciones víricas o isquemia (Moore, 2005). El estrés desencadena una serie de respuestas en la célula que induce la parada del proceso de traducción. Como consecuencia, muchas proteínas de unión a RNA (RBPs) participan en un proceso por el que el mRNA localizado en polisomas desensamblados es transportado a estructuras citoplásmicas transitorias formadas por complejos ribonucleoproteicos (mRNPs), denominados gránulos de estrés (SGs), cuerpos de procesamiento (PBs) o cuerpos que contienen GW182 (GW bodies) (Anderson & Kedersha, 2006). Una red compleja de interacciones entre RNA y RBPs determina si los transcritos se almacenan transitoriamente, se degradan o se reinicia su traducción. SGs y PBs se unen durante breves periodos de tiempo, permitiendo el intercambio de determinados mRNPs. Sin embargo, estos gránulos difieren entre sí. Sólo los PBs se observan en células en crecimiento no sometidas a estrés.

El ensamblaje de SGs (pero no el de PBs) requiere en la mayoría de los casos la fosforilación de eIF2 α (Kedersha et al, 2005). Los componentes de los SGs provienen de

complejos 48S (eIF3, eIF4G, PABP, 40S) mientras que en PBs se encuentran componentes de la maquinaria de descomposición del RNA, como decapping protein 1a o 2 (DCP1a, DCP2). Finalmente, los SGs están relativamente fijos en el citoplasma aunque cambian de forma constantemente, mientras que los PBs se mueven rápidamente por el citoplasma, sin cambio en su tamaño o forma.

a) Gránulos de estrés

Los SGs son complejos de mRNP citoplásmicos que se inducen por estrés celular (Kedersha et al, 1999), por drogas que inhiben la traducción (Dang et al, 2006; Mazroui et al, 2006), por ausencia de eIFs, o por la sobreexpresión de proteínas que afectan negativamente a la traducción (Gilks et al, 2004; Kedersha et al, 2005; Mazroui et al, 2002).

Los SGs son estructuras dinámicas debido al flujo de mRNPs con polisomas desensamblados. La formación de SGs coincide con mRNAs acompañados de factores del complejo 48S (Anderson & Kedersha, 2006; Kimball et al, 2003; Mazroui et al, 2006). Otro grupo de componentes incluye diversas RBPs relacionadas con el metabolismo de RNA como el antígeno intracelular de linfocitos T (TIA-1), G3BP1 (del inglés Ras GTPase SH3 domain binding protein 1), la proteína asociada al síndrome X frágil (FMRP) o proteínas del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). La sobreexpresión de proteínas como G3BP1, TIA-1 y FMRP, que están asociadas a SGs, inducen su ensamblaje. Cuando se sobreexpresan estas proteínas en fibroblastos mio-embriónicos (MEFs) con el mutante negativo de fosforilación de eIF2 α S51A no inducen la formación de SGs, pero la cotransfección de PKR activa revierte esta situación (Kedersha & Anderson, 2007). Muchos factores que ayudan a la agregación de SGs se unen directamente al RNA y poseen dominios de auto-agregación, como es el caso de G3BP1.

El tipo de mRNAs que se localizan en SGs es variable. Se encuentran mRNAs que se ocupan del funcionamiento general de la célula, mientras que no se localizan transcritos que ayudan a la adaptación de la célula al estrés. Aunque no se sabe cómo estos transcritos se excluyen selectivamente de los SGs, comparten características como la ausencia de intrones y la presencia de una 5'-NTR larga y estructurada (Baguet et al, 2007; Rubtsova et al, 2003). Otra característica de algunos mRNAs celulares y RNAs virales que eluden los SGs a pesar de la fosforilación de eIF2 α es la presencia de IRES (Yamasaki & Anderson, 2008).

El ensamblaje de SGs ocurre en varias etapas. En primer lugar se produce la inhibición del inicio de la traducción debido a las causas mencionadas anteriormente. En la segunda etapa se produce la primera agregación de los complejos 48S, componentes esenciales de los SGs. En este paso participan proteínas como G3BP, TIA-1, FMRP y algunos componentes del complejo de supervivencia de la neurona motora (SMN) (Kedersha et al, 2000; Mazroui et al, 2006; McEwen et al, 2005). En la tercera etapa ocurre una agregación secundaria, en la que cada mRNA interactúa con múltiples proteínas. A su vez, las proteínas interactúan entre sí creando una red de interacciones que permite la visualización microscópica de los SGs. La cuarta etapa corresponde a la integración y señalización, en la que proteínas como el factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2) interactúan con las proteínas de los SGs (Yang et al, 2006; Yu et al, 2007). En la quinta etapa algunos mRNAs se desplazan a PBs para su degradación debido a interacciones con proteínas que los transportan a estos últimos; otros se exportan de nuevo al citoplasma o bien se almacenan en SGs mediante interacciones con el antígeno humano R (HuR), entre otras proteínas. Una vez que el estrés celular ha pasado, el desensamblaje de SGs ocurre rápidamente (Kedersha et al, 2000; Kedersha et al, 2005).

b) Gránulos de estrés en infecciones virales

El papel que juegan los SGs en el silenciamiento de la expresión del RNA y su almacenamiento, sugiere que este proceso podría afectar a la replicación viral. De hecho el ciclo infeccioso de numerosos virus se adapta a la respuesta de los SGs (Reineke & Lloyd, 2013). PV induce la formación de SGs en células infectadas de manera independiente de la fosforilación de eIF2 α . La formación de SGs, que contienen G3BP1 y eIF4GI, es máxima a las 2 o 3 horas después de la infección pero disminuye según va transcurriendo la infección. La inhibición de la formación de SGs está mediada por la proteasa 3C^{pro}, que reconoce a G3BP1. La expresión de un mutante de G3BP1 resistente al corte por esta proteasa conduce a una reducción de 7 veces de la replicación viral, sugiriendo un papel antiviral de los SGs (White et al, 2007; White & Lloyd, 2011).

HCV induce la formación de SGs en células infectadas (Garaigorta et al, 2012). A diferencia de otros virus, HCV recluta componentes específicos de los SGs a las factorías de replicación viral, mediante la interacción de G3BP1 y otros componentes de SGs con la proteína viral NS5B y con el extremo 5' de la cadena (-) del RNA durante la infección.

Componentes de SGs, como G3BP1 y ataxina 2, se reclutan en estructuras semejantes a anillos que rodean balsas lipídicas (Ariumi et al, 2011; Yi et al, 2011).

Por el contrario, la infección por rotavirus (RV) activa la fosforilación de eIF2 α pero no induce la formación de SGs en respuesta a estrés oxidativo (Montero et al, 2008). El virus West Nile (WNV) y el virus dengue (DV) inhiben la formación de SGs, debido a que secuestran TIA-1 y TIAR al extremo 3' de la cadena negativa de su RNA, una interacción que es indispensable para la replicación viral. Las regiones 3' y 5' NTR del DV interactúan con proteínas de SGs, como G3BP1, caprina 1 y USP10 (del inglés Ubiquitin specific protease 10) y con proteínas de PBs como DDX6 (Bidet et al, 2014; Li et al, 2002; White & Lloyd, 2011).

Estos datos indican que los SGs pueden tener una función antiviral, ya que los componentes críticos que los forman incluyen proteínas fundamentales para la replicación viral. Proteínas como G3BP1 y TIA-1 son necesarias para la replicación de HCV y DV, respectivamente. Otros componentes esenciales, como la subunidad 40S y eIFs, PTB, PCBP2 y UNR (del inglés upstream of N-Ras) también se encuentran en SGs y son componentes esenciales para la traducción dependiente de IRES (Ariumi et al, 2011; White & Lloyd, 2011).

3. LA PROTEÍNA G3BP1

Existen tres isoformas de G3BP (G3BP1 y G3BP2a,2b) codificadas por distintos genes. G3BP1 se identificó en una co-inmunoprecipitación (Co-IP) de proteínas unidas al dominio SH3 de RasGAP de fibroblastos que sobre-expresaban el factor de crecimiento epitelial (EGF) (Parker et al, 1996). Ras es una proteína pequeña de la familia de las GTPasas responsable de la transducción de señales de receptores acoplados a tirosín quinasa. Como todos los miembros de Ras, esta proteína tiene un estado inactivo (RasGDP) y un estado activo (RasGTP), estimulado por factores GEFs (del inglés Guanosine nucleotide exchange factors). Para pasar de la forma activa a la inactiva es fundamental la acción de las GTPasas de Ras (RasGAPs, genéricamente denominados GAPs) (Figura 5). El dominio SH3 de RasGAP es imprescindible para transducir ciertas señales de Ras de manera independiente a la vía de MAPK (del inglés mitogen activated protein kinase) (Tocque et al, 1997). Este dominio es importante en las rutas de

señalización por Ras que conducen a procesos oncogénicos (Duchesne et al, 1993; Leblanc et al, 1999) o la reorganización del citoesqueleto (Leblanc et al, 1998).

La presencia o ausencia de la proteína RasGAP no afecta a la expresión de G3BP1 (Tourrière et al, 2001). Sin embargo, RasGAP y G3BP1 solo co-inmunoprecipitan en células en crecimiento y depende de la activación de Ras. G3BP1 posee 3 serinas fosforiladas en células quiescentes (Ser149, Ser232 y Ser373), aunque solamente 2 se encuentran en células en crecimiento (Ser149, Ser232). El estado de fosforilación de la Ser149 depende de la presencia de RasGAP; en células quiescentes RasGAP (+/-) G3BP1 contenía las 3 fosfoserinas. En células RasGAP (-/-) no se detectó la Ser149 fosforilada (Tourrière et al, 2001). El estado de fosforilación de la Ser149 afecta alguna de sus funciones, por ejemplo la actividad RNasa (Tourrière et al, 2001) o el ensamblaje y reclutamiento de SGs (Tourrière et al, 2003). De hecho, para el ensamblaje de SGs es necesario que la Ser149 esté defosforilada. La Ser149 se localiza en una secuencia consenso de fosforilación de la quinasa Casein Kinasa II (CKII) según la fosfobase (<http://ebi.ac.uk>) (Irvine et al, 2004; Tourrière et al, 2001).

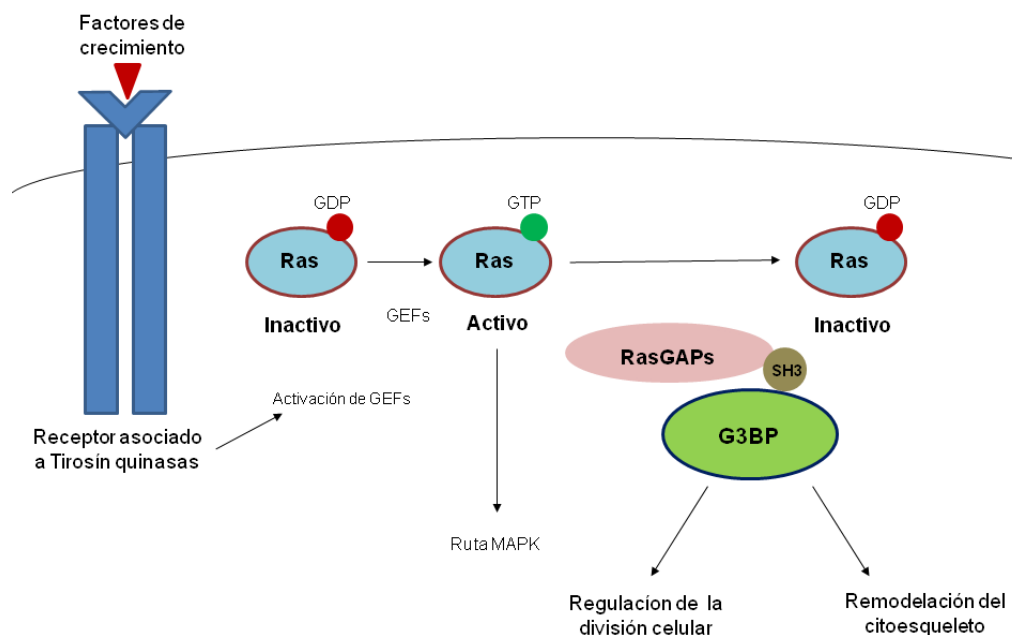


Figura 5. Esquema de la acción de RasGAP. El mecanismo de acción de RasGAP y la transducción de señales de proteínas unidas al dominio SH3 de RasGAPs se discute en el texto.

La estructura primaria de G3BP1 consta de varios dominios (Figura 6). El dominio tipo Nuclear transport factor (NTF2) es el más conservado en las G3BPs de mamíferos. NTF2

es una proteína implicada en la importación al núcleo de Ran-GTP a través del poro nuclear (Ribbeck et al, 1998). Es posible que este dominio de la proteína implique a G3BP1 en el transporte nuclear. El dominio ácido posee la Ser149, cuya fosforilación es importante para la localización y función de la proteína (Tourrière et al, 2003; Tourrière et al, 2001). El dominio PxxP contiene la secuencia consenso mínima para que las proteínas se unan al dominio SH3 de RasGAP (Booker et al, 1993). Sin embargo, ensayos de unión a RasGAP *in vitro* han demostrado que en G3BP1 el dominio tipo NTF2 es el responsable de la unión a RasGAP (Kennedy et al, 2001). En el dominio PxxP se encuentra otra de las serinas fosforiladas, Ser 232.

G3BP1 posee dos motivos de unión a RNA en su extremo C-terminal. El primero es un dominio de reconocimiento de RNA (RRM) que consta de dos pequeñas estructuras, RNP1 y RNP2, separadas por una secuencia de aminoácidos variable en secuencia y longitud, según la especie (Kennedy et al, 2001). El segundo es un dominio rico en argininas y glicinas; a menudo se encuentra en proteínas que poseen un motivo RRM y suele conferir una unión cooperativa a estos últimos (Burd & Dreyfuss, 1994). Los dominios RGG también pueden influenciar la translocación al núcleo (Nichols et al, 2000).

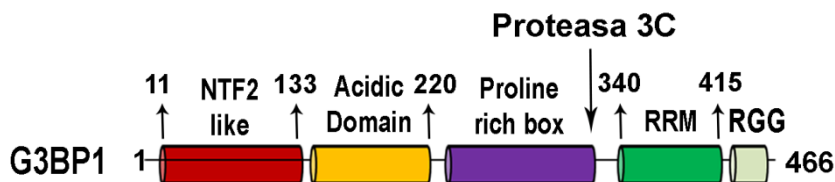


Figura 6. Estructura primaria de G3BP1. Punto de corte de la proteasa 3C de PV. En este esquema se representan los distintos dominios de la proteína G3BP1. A continuación del punto de corte de la proteasa 3C de PV se encuentran los dominios de unión a RNA. RRM y RGG.

3.1 Localización subcelular de G3BP1

G3BP1 y G3BP2a se localizan principalmente en el citoplasma (Parker et al, 1996; Prigent et al, 2000) aunque ambas proteínas tienen capacidad de entrar en el núcleo (French et al, 2002; Tourrière et al, 2001). Otras localizaciones de G3BP1 corresponden a SGs (Tourrière et al, 2003), la fracción insoluble del citoplasma de células en proliferación (Gallouzi et al, 1998) y el retículo endoplasmático de *Saccharomyces cerevisiae* (Cohen et al, 2003b).

El estado de fosforilación de la Ser149 afecta a la localización subcelular de G3BP1 (Gallouzi et al, 1998). La mutación S149A, que destruye el sitio de fosforilación, provoca localización exclusivamente citoplasmática. Por el contrario, la mutación S149E mimetiza una proteína permanentemente fosforilada (Tourrière et al, 2001); tanto en células RasGAP (+/-) como RasGAP (-/-) una fracción de G3BP1 se localizó en el núcleo. Por tanto, cuando la Ser 149 está fosforilada la proteína G3BP1 puede translocarse al núcleo. Al contrario que G3BP1, G3BP2 es exclusivamente citoplásmica en fibroblastos quiescentes, pero entra rápidamente en el núcleo después de estimularlas con suero (French et al, 2002).

3.2 G3BP1 es un componente de varios mRNPs

Como hemos explicado anteriormente, G3BP1 se localiza en SGs en células que han sido expuestas a estrés oxidativo. El reclutamiento de G3BP1 a SGs está influenciado por Ras. Células CCL39 que sobre-expresan Ras reclutan el 100% de G3BP1 a SGs en 20 minutos, mientras que las que no sobre-expresan Ras, necesitan 1 hora. La sobreexpresión de G3BP1 es suficiente para inducir la formación de SGs (Tourrière et al, 2003). Los dominios de G3BP1 muestran un comportamiento diferente en relación a su reclutamiento a SGs. El dominio de unión a RNA (RRM) así como el dominio NTF2-like fueron reclutados por sí mismos a SGs, aunque este último de manera menos efectiva. Este hecho se explica para el caso del RRM porque los SGs son agregados muy ricos en RNA polyA+ y para el caso del NTF2-like, por su capacidad de interactuar con la G3BP1 endógena (Tourrière et al, 2003). Por el contrario, construcciones de G3BP1 con el dominio ácido y el dominio PxxP no se reclutan a SGs, y bloquean el ensamblaje de estos.

Existe una relación directa entre la fosforilación de la Ser149 y los SGs inducidos por estrés oxidativo, ya que después del tratamiento con arsenito, la fosforilación de la Ser149 se reduce cerca del 50%. Este residuo también es crítico para la oligomerización y el reclutamiento de G3BP a SGs. El mutante S149E no oligomeriza, mientras que sí lo hace el mutante S149A. Además, la sobreexpresión del mutante S149E no induce la formación de SGs, al contrario de G3BP1 completa, y de los mutantes S149A y S232E (Tourrière et al, 2003).

A día de hoy, la información disponible acerca de las secuencias reconocidas por G3BP1 procede de experimentos de SELEX (Tourrière et al, 2001) y de inmunoprecipitaciones de RNA asociado a proteínas por entrecruzamiento con luz UV (CLIP) (Ray et al, 2013). En

el experimento de SELEX se mostró que tras cinco ciclos, se obtuvieron 100 secuencias reconocidas por G3BP1 (Tourrière et al, 2001). La secuencia de 10 nt que con más alta probabilidad reconoce G3BP1 se muestra en la Figura 7A, en la que predominan adeninas y sobre todo las pirimidinas. Una lista de mRNA celulares que contienen secuencias semejantes se muestran en la Figura 7B.

El ensayo de CLIP fue realizado con G3BP2 (Ray et al, 2013). En proteínas que comparten más de un 70% de similitud en la secuencia de aminoácidos de los motivos RRM, existe una alta probabilidad de que la secuencia de reconocimiento sea casi idéntica. En este caso, la secuencia reconocida con alta probabilidad por G3BP2 fue AGGAUGA.

A

A C C C A/C U/C A/C C/G G C C/A G/C
 55 56 50 53 37/31 36/34 42/30 37/31 39 46 37/31 38/27 %

B

cdNAs que contienen la secuencia consenso de unión a G3BP1

Especie	Proteína	Posición en el mRNA
<i>Homo sapiens</i>	KIAA0711	3'UTR
<i>Homo sapiens</i>	Ciclina dependiente de quinasa 9	Secuencia codificante
<i>Homo sapiens</i>	Carboxipeptidasa M	5'UTR
<i>Homo sapiens</i>	Tirosin quinasa Lyn	5'UTR
<i>Homo sapiens</i>	Lanosterol sintasa	3'UTR
<i>Homo sapiens</i>	2,3-oxidosqualeno-lanosterol ciclasa	3'UTR

Figura 7. A) Secuencia consenso de ligandos de alta afinidad a G3BP1 obtenidos mediante SELEX. B) RNAs que contienen la secuencia consenso de G3BP1. Tomado de Tourrière et al 2001.

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral han sido:

- 1) Determinación de los sitios de unión de la proteína G3BP1 en el IRES de FMDV
- 2) Determinación del efecto de la proteína G3BP1 sobre la traducción dependiente de IRES y cap *in vivo e in vitro*
- 3) Análisis de la capacidad de G3BP1 de interactuar con otras proteínas implicadas en el inicio de la traducción
- 4) Análisis del estado de G3BP1 durante la infección por picornavirus
- 5) Análisis de las propiedades de los fragmentos amino y carboxilo terminal en la regulación del inicio de la traducción y en la interacción con otras proteínas

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PLÁSMIDOS

1.1 Vectores de expresión de los dominios del IRES

Los plásmidos a partir de los cuales se transcribieron los RNAs correspondientes a los dominios d1-2, d3HH, d5, d5ss y d5H del IRES de FMDV (Figura 8), se describieron en (Lopez de Quinto et al, 2001; Ramos & Martínez-Salas, 1999).

El plásmido que expresó el RNA d5II y los mutantes d5IIbase, d5IIstem y d5U/A se describieron en Piñeiro et al (2013). El mutante d5IICCUU/GAAG se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos Pyr/Pur y Gem3as (Tabla 1)

El plásmido que expresa el RNA dIII del IRES de HCV se describe en Lafuente et al (2002).

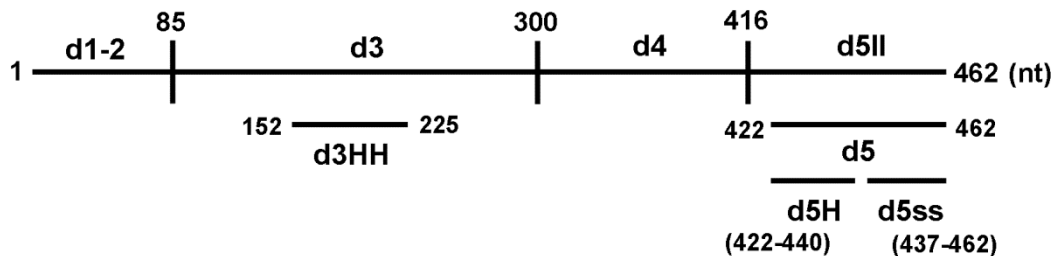


Figura 8. Esquema del IRES de FMDV, distribuido en dominios y subdominios

1.2 Plásmidos de expresión de proteínas

pBIC: Contiene el elemento IRES de FMDV localizado entre los genes de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y luciferasa (Luc) (Martinez-Salas et al, 1993). De manera similar, el plásmido 156.1 contiene el IRES de HCV entre CAT y Luc (Lafuente et al, 2002). El RNA monocistrónico CAT ScaI, se obtuvo digiriendo el plásmido pBIC con el enzima ScaI, seguido de una transcripción *in vitro* con T7 RNA polimerasa.

pCMV-pBIC: Este plásmido se generó subclonando en pCDNA3 (NheI-romo/NotI) el fragmento (MluI-romo/NotI) del vector bicistrónico pBICAvrII-Not (Lopez de Quinto et al, 2002) que contiene la unidad bicistrónica CAT-FMDV IRES-Luc.

pCMV-p156.1: Se obtuvo subclonando en pcDNA3 (NheI-romo/NotI) el fragmento (MluI-romo/NotI) del vector bicistrónico p156.1, de forma semejante a pCMV-pBIC (Pacheco et al, 2009).

pCMV6-G3BP: Este plásmido posee el promotor de citomegalovirus (CMV) seguido de la secuencia no traducida 5' de la variante transcripcional 1 de la proteína G3BP1 humana y la región codificante de la misma (NM_005754.2). Este plásmido fue cedido por el Dr. JM Cuezva (CBMSO).

pRSETA-G3BP: Este plásmido se utilizó para la expresión en bacterias de G3BP1 y su posterior purificación. Se obtuvo mediante digestión SacI/PvuII del plásmido pQE-G3BP. El producto de la digestión fue ligado al plásmido pRSETA.

pGEXK-G3BP: Este plásmido se utilizó para la expresión en bacterias y purificación de la proteína de fusión GST-G3BP1. En primer lugar, se realizó una PCR con los oligonucleótidos G3BP3 y G3BP2 (Tabla 1). El producto de la PCR fue ligado al plásmido pGEMT, obteniéndose el plásmido pGEMT-G3BP. Este plásmido fue digerido con las enzimas HindIII/SmaI y el producto de la digestión se transfirió al vector pGEX-KG.

pGEXKG-NG3BP: Este plásmido se utilizó para la expresión del fragmento amino-terminal de G3BP1 fusionado a la proteína GST. Se realizó una PCR con los oligonucleótidos G3BP12 y G3BP13 (Tabla 1). El producto de la PCR fue digerido con las enzimas HindIII/SmaI y ligado al plásmido pGEXKG.

pGEXKG-CG3BP: Este plásmido se utilizó para la expresión del fragmento carboxilo-terminal de G3BP1 fusionado a la proteína GST. Se realizó una PCR con los oligonucleótidos G3BP14 y G3BP15 (Tabla 1). El producto de esta PCR fue digerido con las enzimas HindIII/SmaI y ligado al plásmido pGEXKG.

pGEXKG-4B: El plásmido se usó para la expresión en bacterias y purificación de la proteína de fusión GST-eIF4B. Se realizó una PCR con los oligonucleótidos GST-4B1 y GST-4B2 (Tabla 1). El producto de la PCR fue digerido con las enzimas HindIII/BamHI y transferido al plásmido pGEXKG.

pcDNA-Xpress-G3BP: Plásmido de expresión en células eucariotas de G3BP1 fusionado al epítipo Xpress en el extremo amino terminal. Se realizó una PCR con los oligos G3BP21 y G3BP25. El producto de la PCR fue digerido con las enzimas BamHI/NotI y ligado al plásmido pcDNA3-Xpress.

pcDNA-Xpress-NG3BP: Plásmido de expresión en células eucariotas del extremo amino terminal de G3BP1 fusionado al epítipo Xpress en el extremo amino terminal. Se obtuvo por PCR con los oligos G3BP21 y G3BP24. Se realizó una ligación del producto de la PCR con el vector pGEMT-easy. El plásmido resultante fue digerido con las enzimas BamHI/NotI y transferido al plásmido pCDNA3-Xpress.

pcDNA-Xpress-CG3BP: Plásmido de expresión en células eucariotas del extremo carboxilo terminal de G3BP1 fusionado al epítipo Xpress en el extremo amino terminal. Se realizó una PCR con los oligos G3BP23 y G3BP25. Posteriormente se realizó una ligación del producto de la PCR con el vector pGEMT-easy. El plásmido resultante fue digerido con las enzimas BamHI/NotI y transferido al plásmido pCDNA3-Xpress.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la generación de plásmidos

<u>NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO</u>	<u>SECUENCIA 5'-3'</u>
G3BP2	GGGAAGCTTTCACTGCCGTGG
G3BP3	GGGCCCCGGGTATGGTGATGGAG
G3BP12	CGGCCCCGGGTATGGTGATGGAG
G3BP13	GCCAAGCTTTCATTGCTCACCAGCCTC
G3BP14	GGGCCCCGGGTATGGGTGACATTGAACC
G3BP15	GGCAAGCTTTCCTGCGGCTGCGC
GST-4B1	GCTTGGATCCATGGCGGCCTCAG
GST-4B2	CGGCAAGCTTCTATTCGGCATAATCTTCTC
G3BP21	TCATTGCTCACCAGCCTC
G3BP23	TCCTGCGGCTGCGC
G3BP24	GGATCCTATGGTGATGGAGAAG
G3BP25	GGATCCTGGTGACATTGAAC
Pyr/Pur	GGCCTCGAGCTCAGGGTCATTAATTGTACTTCAAAGGTGC
Gem3	TCTGTGGATAACCGTATTACCGCC
Gem3 as	GGCGGTAATACGGTTATCCACAGA

2. BACTERIAS

E. coli DH5 α (F⁻, recA1, hsdR17, rK⁻, mK⁻, lacZY, argF, U169, supE44, thi1, gyrA96,relA1) (Hanahan, 1983).

E. coli BL21 (DE3): Estas bacterias contienen insertado el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac UV5* (F⁻,ompT⁻, rB⁻, mB⁻, recA⁺, lon⁻, dcm⁻) (Studier & Moffatt, 1986).

E. coli ROSSETTA GAMI (DE3): Esta cepa posee la propiedad de estimular la formación de puentes disulfuro además de producir tRNAs AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA para la producción de proteínas recombinantes de difícil obtención en otras cepas. Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F['][lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^R, Str^R, Tet^R).

3. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* Y PREPARACIÓN DE SONDAS RNA

Como primer paso para sintetizar el RNA, los plásmidos se linearizaron con la enzima correspondiente (Tabla 2). El DNA linearizado se fenolizó y se precipitó en presencia de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, 2 µg de glucógeno y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La transcripción *in vitro* se realizó durante 1 h a 37°C, usando T7 RNA polimerasa en la solución de transcripción (100 mM Tris-HCl pH 7,9, 100 mM MgCl₂, 0.5 mM rNTPs, 50 mM ditiotreitól (DTT), 10 U RNase out (Invitrogen)). Transcurrida 1 h, se digirió el molde con 1 U de DNasa (Invitrogen) incubándose 20 min a 37°C.

El RNA sintetizado fue fenolizado y precipitado en presencia de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, 2 µg de glucógeno y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Para comprobar la integridad y concentración del RNA transcrito, se analizó en geles de agarosa al 1% cargando diluciones 1/5 y 1/10 del producto de transcripción, visualizados mediante tinción con BrEth. Para la síntesis de RNA marcado uniformemente, la reacción de transcripción se realizó en presencia de P³²-CTP (400 Ci/mmol). El isótopo no incorporado se eliminó mediante exclusión cromatográfica (Fernández-Miragall & Martínez-Salas, 2003). A continuación el RNA se fenolizó y precipitó con 5 volúmenes de acetato amónico 5 M, 2 µg de glucógeno y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en TE a una concentración final de 0.04 pmol/ml (~ 2 x 10⁵ cpm/ml). La integridad de los RNAs fue examinada en un gel desnaturizante (6% acrilamida, 7 M Urea).

4. TRADUCCIÓN *IN VITRO*

Los RNAs bicistrónicos CAT-IRES-LUC obtenidos a partir de los plásmidos CMV-pBIC y CMV-pBIC 156.1 y monocistrónicos CAT(ScaI) obtenido a partir del plásmido CMV-pBIC, g5.3 (Piñeiro et al, 2013) y G3BP1 a partir del plásmido pCMV6-G3BP, se utilizaron para realizar ensayos de traducción *in vitro*. La traducción *in vitro* se realizó como se describe en (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 1999).

Para ver el efecto de G3BP1 sobre la traducción *in vitro* de los RNAs bicistrónicos y monocistrónicos CAT y G5.3, se traduce primero RNA de la proteína G3BP1.

Transcurridos 15 min, se añaden los RNAs bicistrónicos o monocistrónicos hasta completar 1 h de tiempo final. En el caso de añadir proteínas purificadas a la mezcla de traducción, la mezcla de traducción contiene 50% de lisado de RRL en un volumen final de 15 μ l.

Tabla 2. Enzimas usadas para linearizar los plásmidos usados para transcribir *in vitro*.

<u>PLÁSMIDO</u>	<u>ENZIMA</u>	<u>RNA</u>
pGEM- IRES	XhoI	IRES
pGEM- d5	XhoI	d5
pGEM- d5 ss	XhoI	d5ss
pGEM- d5 H	BamHI	d5H
pGEM- d1-2	HindIII	d1-2
pGEM- d3HH	BamHI	d3HH
pGEM- d5 U/A	BamHI	d5II U/A
pGEM- d5 CCUU/GAAG	XhoI	d5II CCUU/GAAG
pCMV6- G3BP	SmaI	G3BP1
pBIC	Sca I	CAT
pBIC	NotI	CAT-IRES FMDV-Luc
pBIC_156.1	NotI	CAT-IRES HCV-Luc
pGEMI- g5.3	NheI	G5.3
pET28a-PTB	XhoI	PTB
pET736-4B	HindIII	eIF4B

5. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

Las líneas celulares IBRS2, BHK-21, HEK 293, HEK 293T se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 5%.

6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CITOPLÁSMICOS S10

Se cultivaron células HEK293 y BHK-21 en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%. Cuando la monocapa llegó a confluencia, se lavaron 2 veces con solución salina fosfatada (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) (PBS) frío y se

recogieron en 5 ml del mismo tampón con un barredor estéril. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y el sedimento resultante se resuspendió en 1 volumen de tampón hipotónico (10 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KAc, 1,5 mM MgAc₂, 2,5 mM DTT) a 4°C. A continuación, se aplicaron 30 golpes en un homogenizador de vidrio (1 mL, Kontes) con la misma cadencia, en hielo. El lisado final se centrifugó 5 min a 5000 rpm a 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante del paso anterior se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min, desechando el sedimento. Finalmente, se determinó la concentración total de proteínas en el sobrenadante por el método de Bradford (Biorad). El extracto S10 se ajustó a 3% de glicerol y se almacenó a -70°C.

7. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS PURIFICADAS

7.1 Expresión y purificación de G3BP1

Se transformó *E.coli* BL21 con el vector pRSETA-G3BP y se cultivó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (A_{600}) de 0,5. La expresión de la proteína recombinante fue inducida con isopropyl 1-tio-D-galactopiranosido (IPTG) (0,5 mM) durante 1 h a 30°C. Las células se recogieron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 8 ml de solución de unión 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol y 0,5 mM ditioneitol (DTT). Las muestras se sonicaron 3 veces durante 20 segundos en hielo, dejando entre pulso y pulso un descanso de 10 segundos. Después de una centrifugación a 14000 rpm durante 15 min a 4°C se recogió el sobrenadante.

Para la purificación por cromatografía de afinidad, el sobrenadante del paso anterior se pasó a través de una columna de Ni-Sefarosa 6 (GE Healthcare). La purificación consiste en 3 pasos. Primero, la columna se lava 3 veces con 10 ml de solución de unión para eliminar las proteínas que no se hayan unido; segundo, se realiza un lavado adicional con una solución de unión que contiene 50 mM imidazol; tercero, la proteína recombinante se eluyó con solución de elución 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol. Se recogieron 5 fracciones de 1 mL cada una, separando alícuotas de 5 µl para analizarlas mediante SDS-PAGE. Las fracciones con mayor pureza de G3BP1 fueron dializadas en una solución 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 1 mM de ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) y 0,01 mM DTT durante 2 h a 4°C, seguido de una solución 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01 mM DTT y 50% glicerol toda la noche a 4°C.

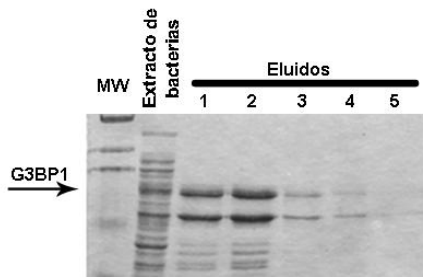


Figura 9. Gel teñido con Coomassie Blue de la purificación de G3BP1 en BL21.

7.2 Expresión y purificación de GST-G3BP1

Bacterias *E. coli* BL21 transformadas con el vector pGEXK-G3BP se cultivaron a 30°C hasta una densidad óptica (A_{600}) de 0,5. La expresión de la proteína recombinante fue inducida con 0,5 mM de IPTG durante 2 h a 30°C. Transcurridas 2 h, se centrifugó la muestra a 6000 rpm durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 5 mL de PBS, 2 mM DTT. Las muestras se sonicaron 3 veces durante 20 segundos en hielo, dejando entre pulso y pulso un descanso de 10 segundos. Después se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante.

El sobrenadante se puso en contacto con 100 μ l de resina de glutatión sefarosa (GE Healthcare), previamente lavada 3 veces con 5 volúmenes de PBS y se incubó durante 45 min a 4°C en una noria giratoria. A continuación, se realizaron 3 lavados sucesivos con 5 volúmenes de PBS, 2 mM DTT centrifugándose a 3000 rpm durante 2 min eliminándose el sobrenadante. Después del tercer lavado se añadió 0,5 volúmenes de glicerol (85%). Se recogieron alícuotas de 15 μ l para analizar las muestras mediante SDS-PAGE.

Para la obtención de la proteína recombinante GST se sigue el mismo protocolo con *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-KG.

7.3 Purificación de PTB y eIF4B

E. coli BL21 transformadas con los vectores pE36T74B His (eIF4B) y pET-PTB, se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (A_{600}) de 0,6. La expresión de la proteína recombinante fue inducida con IPTG 0,5 mM durante 2 h a 37°C. Las células se recogieron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 8 ml de solución de unión (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) y 0,5 mM DTT. Las muestras se sonicaron 2 veces durante 10 segundos en hielo, dejando entre

pulso y pulso un descanso de 10 segundos. Después de una centrifugación a 14000 rpm durante 15 min a 4°C se recogió el sobrenadante.

Para su purificación, el sobrenadante del paso anterior se pasó a través de una columna de Ni-Sefarosa 6 (GE Healthcare). La purificación consiste en 3 pasos semejantes a los de la purificación de G3BP1. Las proteínas se dializaron en la misma solución que para G3BP1.

8. ENSAYOS DE INTERACCIÓN RNA-PROTEÍNA

8.1 Ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética

Los RNAs marcados uniformemente (0.01-0.02 pmol \sim 25- 50 x 10⁴ cpm) descritos en el apartado 3, se incubaron en 5 mM HEPES pH 7,4, 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y 4% glicerol junto con proteína purificada G3BP1 durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se añadió 1 μ l de una solución de Xilen-Cianol (Xilencianol 0,5%, 1 M Tris pH 7,8, glicerol 48,5%). Los complejos RNA-proteína fueron analizados por electroforesis en geles nativos de acrilamida-bisacrilamida 6% suplementados con 2,5 mM MgCl₂. La electroforesis se lleva a cabo a 4°C durante 23 min a 200 V en tampón TBM (45 mM Tris-HCl pH 8,3, 43 mM ácido bórico, 0,1 mM MgCl₂). Los geles secos fueron analizados mediante autorradiografía. La intensidad de las bandas de los complejos retardados se cuantificó en el densitómetro GS-800 (Biorad), normalizando respecto de la intensidad de la banda obtenida en el carril sin proteína, que se estableció como el 100%. Los valores se corresponden a la media de 3 experimentos.

8.2 Ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta

RNAs marcados uniformemente (0,04 pmol \sim 1- 2 x 10⁵ cpm) se incubaron con las cantidades indicadas de las proteínas purificadas G3BP1, PTB, o con extractos S10 de células BHK-21 (40 μ g) e irradiados con luz ultravioleta como se describe en (Lopez de Quinto et al, 2001). Para aumentar la especificidad de los extractos S10 en el entrecruzamiento, se añadió un exceso de 200 veces de RNA citoplásmico (RNAc). A continuación del tratamiento con RNasa A, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. Las proteínas resultantes del entrecruzamiento fueron visualizadas por autorradiografía de geles secos.

9. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

La concentración de proteína de fusión se calibró por comparación con los marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein™ Prestained Standards All blue BIORAD) en un gel SDS-PAGE teñido con Commasie Blue. En el ensayo se añadieron 4 µg de proteína de fusión, 5 volúmenes de tampón de unión (50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0,5% Igepal CA-630, 10% Glicerol) y la cantidad deseada de proteína problema o extracto celular. En los experimentos que se indican, se añadió RNA (IRES, d5, d1-2, o dIII) para obtener una concentración final de 15 mM. Se incubaron 1 h en la Noria a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y se añadió 5 volúmenes de tampón de unión, incubándose 5 min a 4°C. Una vez se ha realizado el lavado 3 veces, las muestras se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE y se analizaron Western Blot mediante anticuerpos específicos.

10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD

Para medir la concentración de proteínas en extractos de células HEK293T se usó el reactivo Protein Assay (Bio Rad) y una placa P96 (BD Falcon). Para la curva patrón se usó BSA (1 mg/ml) desde 0 a 12 µg disuelta en 12 µl de H₂O. A continuación, se añadió una mezcla de 188 µl compuesta por 148 µl del reactivo Protein Assay y 40 µl de H₂O por pocillo. La cantidad de proteína de los extractos celulares se determinó por triplicado, midiendo la absorbancia a 595 nm en el dispositivo Bio Rad iMark Microplate reader. Las concentraciones se obtuvieron a partir de la curva patrón de BSA.

11. WESTERN BLOT

Para la inmunodetección de proteínas, primeramente se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de PVDF (BIORAD) en semiseco (Trans Blot Turbo Biorad). Las membranas se bloquearon con solución salina de Tris (6,5 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,15 M NaCl) (TBS)-leche 6% durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con TBS-Tween20 0,1% durante 10 min. Los anticuerpos específicos α-G3BP1 (1/750) monoclonal de ratón (BD Transduction), α-Xpress (1/3000) monoclonal

de ratón (Invitrogen), α -PTB (1/1000) monoclonal de cabra (ACRIS), α -eIF4B (1/2000) monoclonal de conejo (Novus), α -eIF4G (1/2000) policlonal de conejo (cedido por la Dra. Amelia Nieto), α -hnRNPA1 (1/2000) de conejo (Immuquest), α -DHX9 (1/2000) de conejo, α -Actina (1/5000) de ratón (SIGMA), α -Tubulina (1/5000) de ratón (SIGMA) se incubaron en TBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Después de lavar la membrana 3 veces con TBS-Tween20 0,1% durante 10 min, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente α -IgG de ratón 1/2000 policlonal de conejo (BioRad), α -IgG de conejo 1/2000 policlonal de ratón (BioRad), α -IgG cabra 1/6000 policlonal de conejo (Sigma) acoplado a horseradish peroxidase (HRP) durante 1 h 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, después de 3 lavados con TBS-Tween20 0,1% durante 10 min, se revelaron mediante quimioluminiscencia con ECL (Amersham) o ECL plus (Cell signaling). En el caso de que la membrana se incubara con otros anticuerpos, se lavó durante 30 min a 70°C en la solución de lavado 0,2 M Glicina en TBS-Tween20 0,1%.

12. ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA

Transfecciones e infecciones

Células BHK-21 o HEK293T se cultivaron en placas M6 hasta alcanzar una confluencia cercana al 90% para ensayos de 24 h, o una confluencia del 70-80% para ensayos a 48 h. Para producir RNA desde el promotor T7, las células se infectaron con el virus recombinante vaccinia vT7F-3 que expresa la RNA polimerasa del fago T7 (Fuerst et al, 1986). Tras 1 h de adsorción, se transfectaron con los plásmidos pLb que produce la proteasa Lb de FMDV (Martinez-Salas et al, 1993) y pRSK-3CA10 que produce la proteasa 3C de FMDV (Belsham et al, 2000) usando lipofectamina (GIBCO BRL). A las 4 h se repuso el medio con 5% suero fetal y se prepararon extractos celulares crudos 20 h después de la adicción de suero. Tras pasar dicho tiempo, se incubaron las células con 100 μ l de solución de lisis C (Igepal 0,5%, 120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,8) durante 1 min recogiendo las muestras en alícuotas separadas para su centrifugación a 10000 rpm durante 4 min. Posteriormente el sobrenadante fue recogido y analizado.

Para las transfecciones con vectores que llevan el promotor CMV se cultivaron las células en placas M6 hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Se mezclaron diferentes cantidades de los plásmidos correspondientes junto con lipofectamina (GIBCO BRL) hasta

un volumen final de 32 μ l. Se lavaron los pocillos con DMEM para eliminar suero fetal bovino, se añadió 1 ml de DMEM incubándose durante 4 h las mezclas de los plásmidos y la lipofectamina. Tras 4 h, se añadió 1ml de DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Tras 44 h de incubación, las células se trataron con solución de lisis C durante 1 min recogiendo las muestras en alícuotas separadas para su posterior centrifugación a 10000 rpm durante 4 min y recogida del sobrenadante.

Las infecciones de células BHK-21 con FMDV, EMCV y Swine vesicular disease virus (SVDV) se realizaron como se describe en Piñeiro et al, 2012.

13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad Luciferasa (Luc) se determinó valorando en un luminómetro la emisión de fotones sobre el sustrato luciferina en el tampón luciferasa (15 mM $MgSO_4$, 2,5 mM glicilglicina pH 7,8, 5 mM ATP, 1 mM DTT, BSA 0,1 mg/ml). La actividad relativa se expresa como unidades Luz por μ g de proteína total, determinada por la reacción de Bradford.

La actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se estimó valorando la capacidad del extracto de acetilar cloranfenicol a partir de $AcCoA-H^3$ en 0,1 mM TrisHCl pH 7,8, 2 mM cloranfenicol, 10 mM AcCoA y 5 μ Ci $AcCoA-H^3$. Las muestras fueron añadidas a la mezcla de reacción, incubadas a 37°C durante 2 h. La reacción se detuvo con borato sódico. Los productos de la reacción acetilados se separaron del resto por extracción con 1 ml de líquido de centelleo para muestras orgánicas. Las cpm de la fase orgánica se determinaron en un contador de centelleo.

RESULTADOS

1. Identificación del sitio preferente de unión de G3BP1 al IRES de FMDV.

Datos de riboproteómica en nuestro laboratorio identificaron diversos factores asociados al dominio 3 (d3) y al dominio 5 (d5) del IRES de FMDV, o al dominio III (dIII) de HCV (Pacheco et al, 2008). Uno de esos factores fue la proteína G3BP1, asociada al dominio 5 de FMDV. Los resultados del ensayo de riboproteómica no demuestran si dichos factores se unen directamente al RNA. Por tanto, nuestro primer objetivo fue determinar si G3BP1 podía unirse directamente al IRES de FMDV para, después, poder identificar el sitio preferente de unión.

El abordaje experimental elegido para resolver esta cuestión fue el análisis de retardo en gel. En esta técnica se ponen en contacto el RNA marcado uniformemente con P^{32} junto con la proteína purificada de interés. Los complejos RNA-proteína se separaron mediante electroforesis en condiciones nativas. Si la proteína interacciona con el RNA, el complejo RNA-proteína tendrá una movilidad menor que el RNA.

En primer lugar, como G3BP1 fue identificada unida al d5 de FMDV (Figura 10A), se marcó uniformemente el RNA del d5 con α -CTP P^{32} , y se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando cantidades crecientes de G3BP1 purificada. El resultado indicó que G3BP1 era capaz de interactuar directamente con el RNA d5 (Figura 10B). Además, se marcaron con α -CTP P^{32} el dominio 1-2 (d1-2) o la parte apical del dominio 3 (d3HH) del IRES de FMDV (Figura 10A) y se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando cantidades crecientes de la proteína G3BP1 purificada. Como puede observarse en la Figura 10B, G3BP1 también interaccionó directamente con estos dominios. Sin embargo, comparando la capacidad de unión de G3BP1 a todos los dominios, se observó una unión preferente al RNA d5 (Figura 10C).

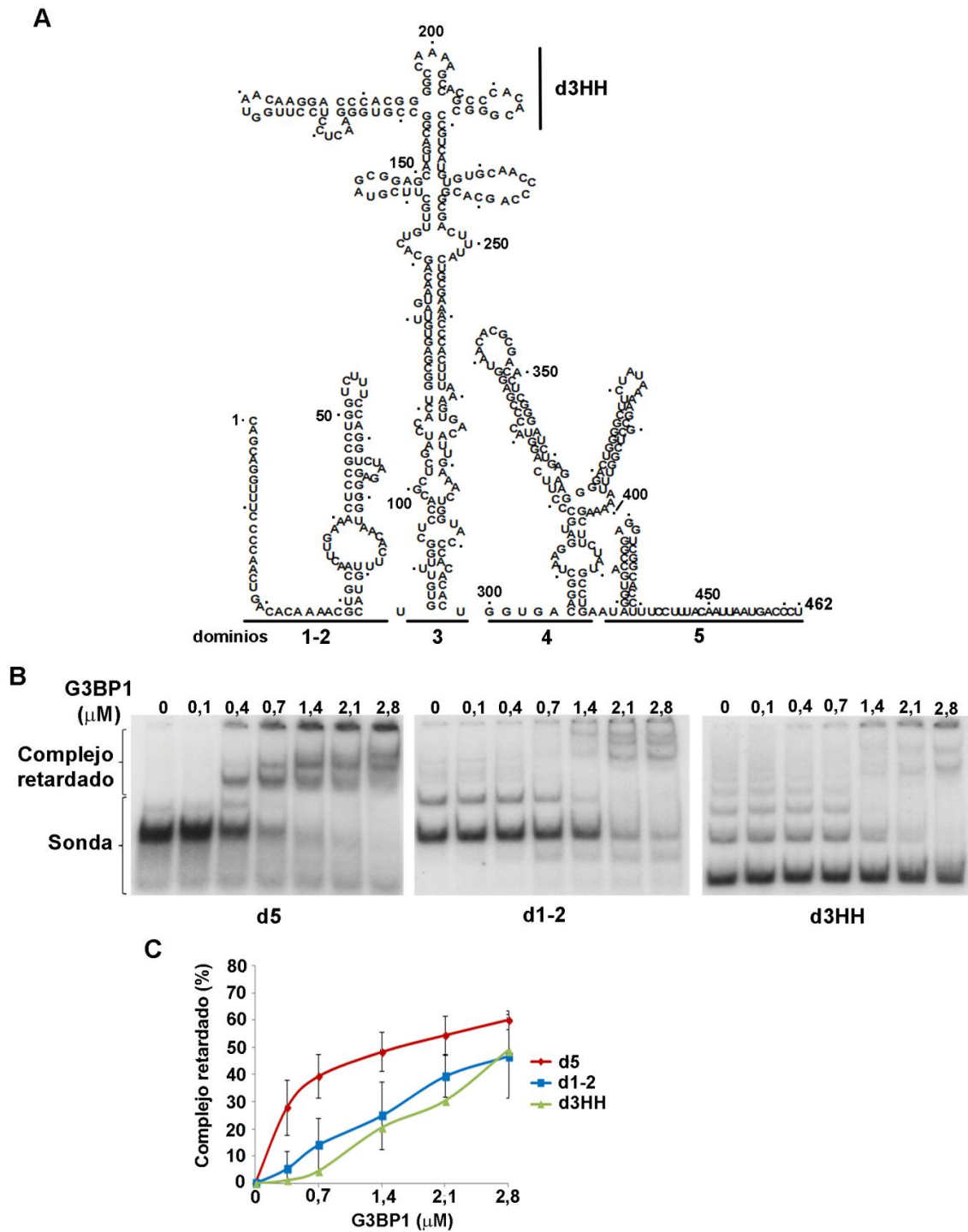


Figura 10. Identificación del sitio preferente de unión de G3BP1 al IRES de FMDV. A) Estructura secundaria del IRES de FMDV con indicación de los dominios (1-5). **B)** Autorradiografía de los retardos en gel de distintos dominios del IRES incubados con proteína G3BP1 recombinante. **C)** Representación gráfica de la capacidad de unión de G3BP1 a los dominios del IRES. La capacidad de unión está expresada como el porcentaje de la intensidad de la banda del complejo retardado respecto a la sonda libre (100%). Las barras de error indican la desviación estándar (SD) de tres o más experimentos independientes.

Se realizaron ensayos de competición entre los RNAs descritos anteriormente para verificar la unión preferente al d5. Los RNAs usados fueron d5, d1-2 y RNAc (Figura 11). Los resultados mostraron que el competidor más fuerte fue el RNAc, tanto para d5 como para d1-2 (Figura 11A, B). Sin embargo, fue significativo el hecho de que usando RNA frío d5 o d1-2 para competir la unión de G3BP1 por d1-2 o d5, respectivamente, se observaran pequeñas diferencias en la relación 1:50. Sin embargo a concentraciones más bajas de competidor, el RNA d1-2 ejerce un efecto ligeramente superior al d5 (Figura 11A).

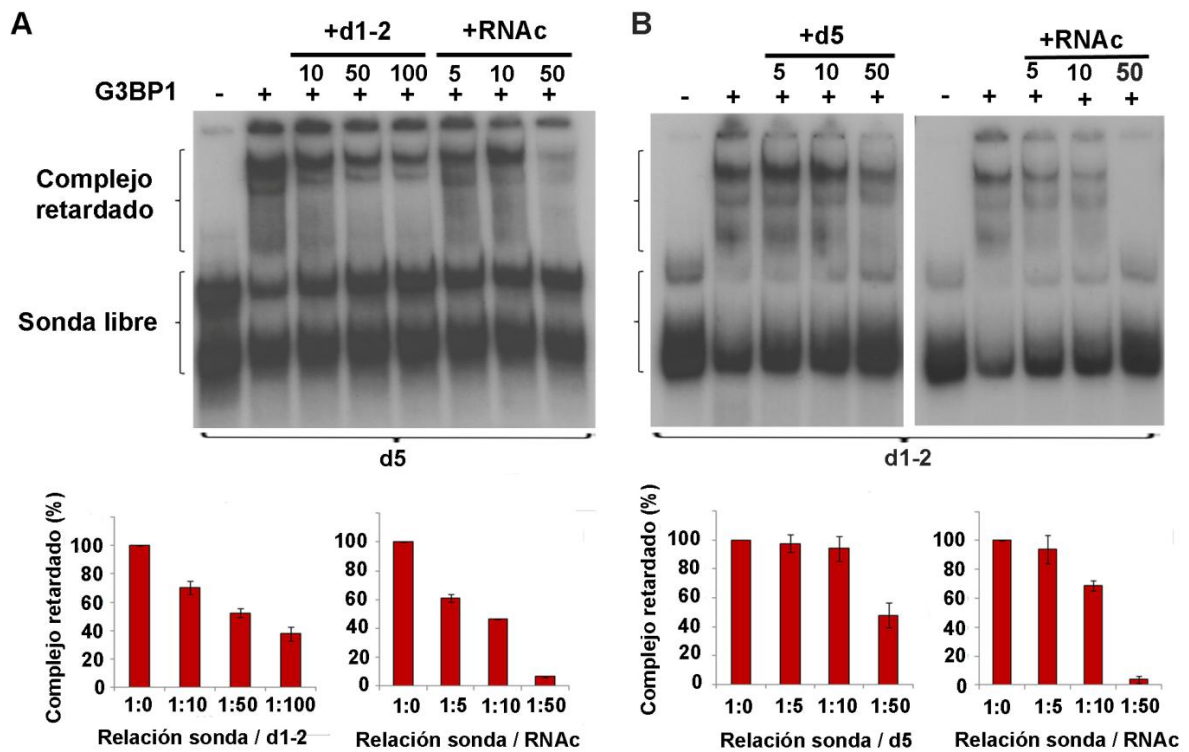


Figura 11. Ensayos de competición por la unión a G3BP1 entre RNAs de diferentes dominios. A) Autorradiografía de los ensayos de retardo en gel entre P³² d5, RNA d1-2 y RNAc con G3BP1 (1,4 μM). En la parte inferior se representa la intensidad de las bandas de los complejos P³² d5 y G3BP1 en presencia o ausencia de diferentes proporciones de RNAs competidores. El porcentaje de complejo retardado se obtiene al dividir la intensidad de la banda del complejo retardado entre la sonda libre (considerada el 100%). **B)** Autorradiografía de los retardos en gel entre P³² d1-2, en presencia de RNA d5 y RNAc con G3BP1 (1,4 μM). En la parte inferior se representa la intensidad de las bandas de los complejos P³² d1-2 y G3BP1, en presencia o ausencia de diferentes proporciones de RNAs competidores.

Aunque no se había identificado asociada al IRES de HCV, quisimos comprobar si G3BP1 podía asociarse al dIII de HCV mediante la técnica de retardo en gel. Se marcó con α-CTP P³² el dIII del IRES de HCV (Figura 12A) y se realizaron ensayos de retardo en gel

utilizando cantidades crecientes de G3BP1 purificada. El resultado indicó que G3BP1 se unía al dIII de HCV, incluso con mayor afinidad que al d5 de FMDV. Para verificar este hecho se realizaron ensayos de competición. Los resultados indican que un exceso de 500 veces de RNA d5 o d1-2 no desplazaron su unión al dIII (Figura 12B). Además, se necesitan 10 veces de RNAc en comparación con d5 o d1-2 para desplazar la unión de G3BP1 al dIII (Figura 12B).

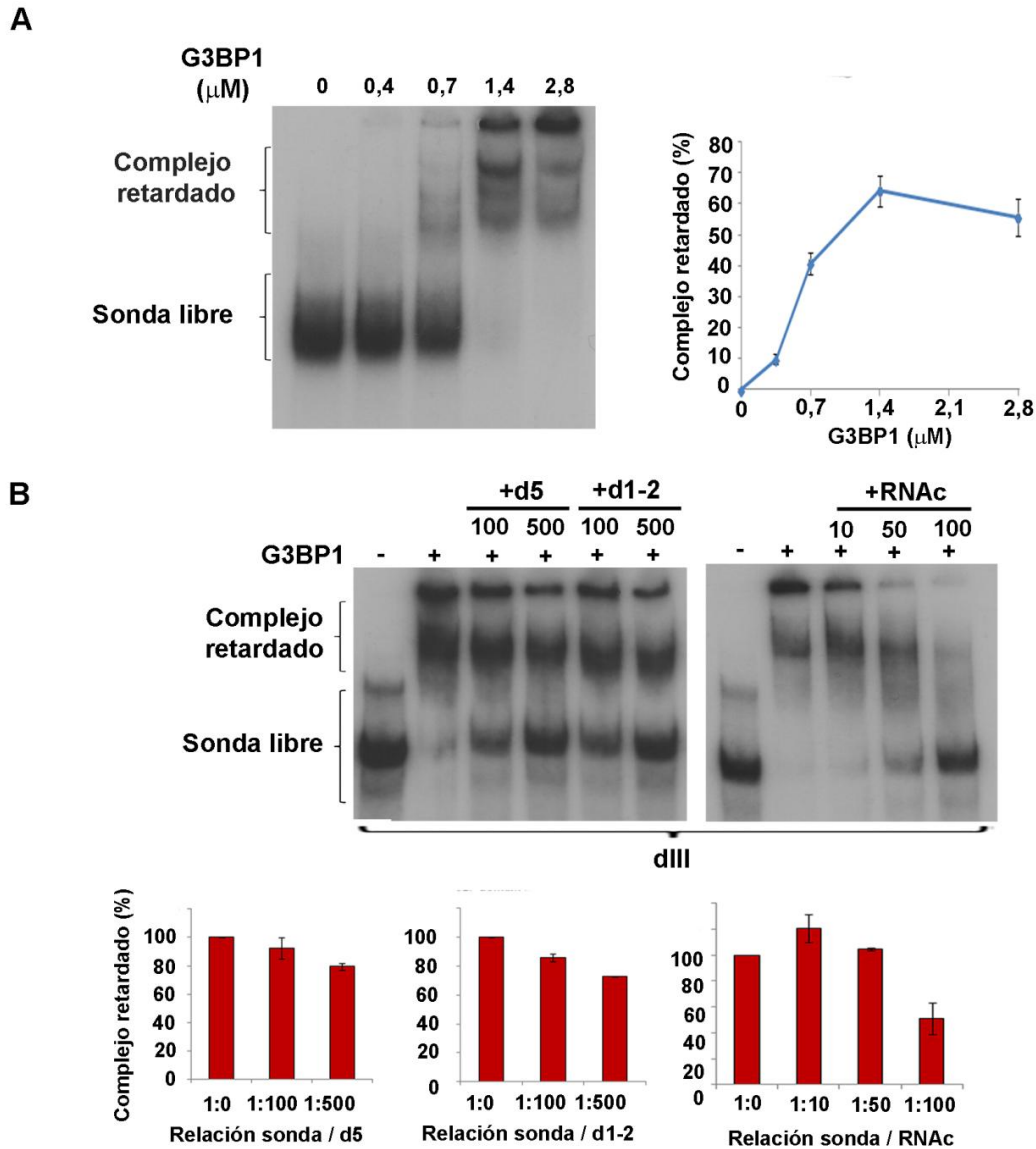


Figura 12. Unión de G3BP1 al dIII del IRES de HCV. A) Autorradiografía de los retardos en gel del dIII del IRES de HCV y G3BP1 recombinante. Representación gráfica de la capacidad de unión de G3BP1 al dIII expresada como el porcentaje de la intensidad de la banda del complejo retardado respecto a la sonda libre (100%). Las barras de error indican la desviación estándar (SD) de tres o más experimentos independientes. **B)** Ensayos de competición entre P³² dIII y distintos RNAs. Autorradiografía de los ensayos de retardo en gel entre P³² dIII, RNA d5, d1-2 y RNAc con G3BP1 (1,4 μM). En la parte inferior se representa la intensidad de las bandas de los complejos P³² dIII y G3BP1 en presencia de diferentes proporciones de RNAs competidores.

1.1 Caracterización del sitio de unión de G3BP1 al dominio 5 del IRES de FMDV.

Una vez establecido que el sitio preferente de unión de G3BP1 en el IRES de FMDV se encontraba en el d5, se realizaron una serie de construcciones para identificar la secuencia de nucleótidos reconocida por esta proteína. Primero, el RNA d5 se dividió en dos regiones, la horquilla (d5H) y la región de cadena lineal (d5ss) (Figura 13A). Los resultados obtenidos demostraron que la capacidad de unión de G3BP1 fue más eficientemente al RNA d5ss que al d5H (Figura 13B). Sin embargo, se observó una notable diferencia entre la eficiencia de unión al RNA d5ss y al d5 (Figura 10B). Por tanto, la horquilla del d5 ayuda a estabilizar la unión al d5 completo.

Los resultados obtenidos con los mutantes del d5II apoyaron la hipótesis de que la región preferente de unión de G3BP1 al d5 se localiza en la región de cadena sencilla. La comparación del d5II con d5II-base y d5II-stem (Figura 14B), demostró que la afinidad de G3BP1 por d5II-base fue mayor que por d5II. La predicción de estructura de este mutante indica que los nucleótidos 437-440 están desapareados y por tanto, la región de cadena sencilla es más larga (Figura 14A). Por el contrario, d5II-stem presentó muy poca diferencia con el RNA d5II. Los mutantes de la región de cadena sencilla U/A y CCUU/GAAG presentan más afinidad por G3BP1 que d5II. Otro dato interesante fue que la capacidad de unión de G3BP1 por el RNA d5 es mayor que por d5II, siendo este último el que posee los nucleótidos de la región 415-422 y por tanto los nucleótidos 437-440 de la base de la horquilla del d5 están apareados (Figura 14A).

De estos resultados podemos sacar las siguientes conclusiones. Primero, G3BP1 permite flexibilidad a la hora de reconocer RNAs y no presenta una única secuencia específica de reconocimiento. Segundo, la zona de contacto preferente de G3BP1 con d5 se localiza entre los nucleótidos 437-447, una región desapareada del IRES.

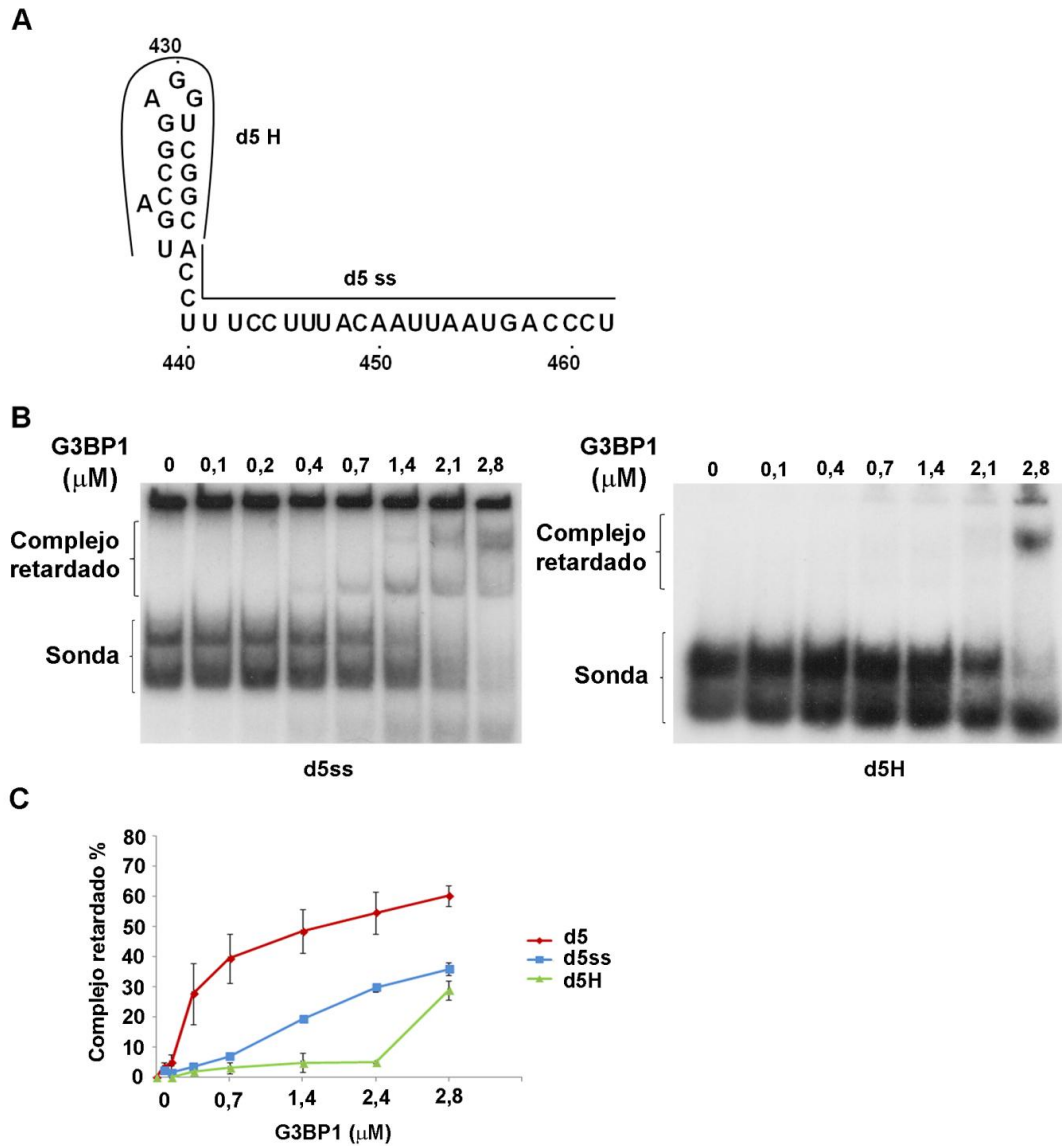


Figura 13. Caracterización del sitio de unión de G3BP1 al d5. A) Esquema de la estructura del d5H y d5ss. **B)** Autorradiografía de los retardos en gel de la región de cadena sencilla del d5 (d5ss) y la horquilla (d5H) con G3BP1. **C)** Representación gráfica de la capacidad de unión de G3BP1 a estos dominios, expresada como el porcentaje respecto a la sonda libre en cada caso. Las barras de error indican la SD de al menos tres experimentos independientes.

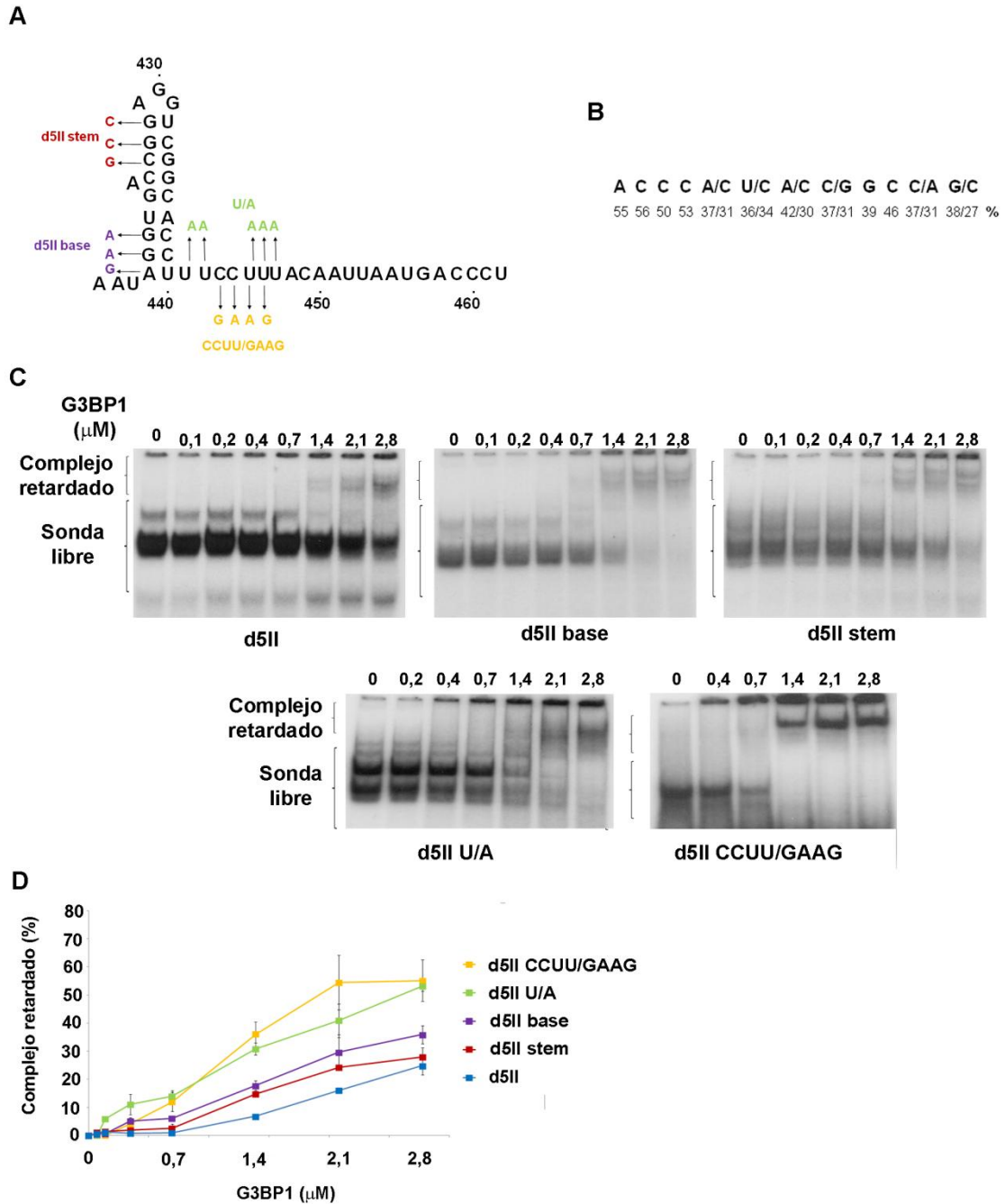


Figura 14. Análisis mutacional del RNA d5 para caracterizar la zona preferente de unión de G3BP1. **A)** Esquema de las mutaciones realizadas sobre el RNA d5II. Cada mutante está representado por un color. **B)** La secuencia consenso obtenida mediante SELEX está representada en la parte derecha; el % en cada posición indica la presencia de cada base. **C)** Autorradiografía de ejemplos representativos de los ensayos de retardo en gel de los mutantes del RNA d5II y G3BP1. **D)** Representación gráfica de la capacidad de unión de G3BP1 a los mutantes en los dominios del IRES. La capacidad de unión está expresada como la intensidad de la banda del complejo retardado respecto la sonda libre en cada caso. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) de tres o más experimentos independientes.

2. G3BP1 es un inhibidor de la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap.

G3BP1 es una proteína clave en el ensamblaje de SGs (Anderson & Kedersha, 2006); su sobreexpresión induce la formación de SGs (Tourrière et al, 2003). Los SGs son agregados ribonucleoproteicos que se forman en la célula durante situaciones de estrés, por ejemplo, estrés oxidativo, choque térmico o infecciones víricas (Anderson & Kedersha, 2006). Debido a que los SGs contienen mRNAs, junto con complejos 48S y otras RBPs que no están implicadas en la degradación del RNA, representan agregados donde la traducción de los RNAs localizados en ellos está silenciada transitoriamente. Sin embargo, al comienzo de esta Tesis existía poca información sobre el papel de G3BP1 en el control de la traducción, con la excepción del mRNA de β -F1-ATPasa (Ortega et al, 2010). En este trabajo vamos a abordar el estudio *in vitro* e *in vivo* del papel que la proteína G3BP1 desempeña en la traducción dependiente de IRES y de cap.

2.1 G3BP1 es un inhibidor de la traducción *in vitro*

En el sistema de traducción *in vitro* basado en reticulocitos de conejo (RRL) (Figuras 15 y 16) se usó el RNA de G3BP1 seguido de RNA bicistrónico derivado del plásmido pBIC (Figura 15A). En este RNA, la traducción de Luciferasa (Luc) depende del IRES de FMDV mientras que la traducción del cloranfenicol acetil transferasa (CAT) es dependiente de 5'. Durante la traducción *in vitro* las proteínas sintetizadas incorporan Met-S³⁵, lo que permite cuantificar la síntesis de proteínas mediante autorradiografía de un gel SDS-PAGE (Figura 15B), midiendo la intensidad de las bandas correspondientes.

Como se observa en la Figura 15C, tanto la intensidad de la banda de Luc, como la de CAT disminuyeron en presencia de G3BP1. Debido a que las bandas de G3BP1 y Luc están muy cercanas, también se midió la actividad Luc en el luminómetro, verificando que la actividad Luc disminuyó en presencia de G3BP1 (Figura 15D). Para ver si la inhibición dependiente de IRES y de 5' ocurre de forma independiente, se usaron RNAs monocistrónicos en los que el IRES dirige la traducción de un fragmento de la proteína Gemin5 (G5.3) y otro, donde CAT se traduce de forma dependiente de 5'. Como se observa en la Figura 15E y 15F, la expresión de G3BP1 inhibió la síntesis de ambas proteínas.

Como hemos expuesto en el apartado anterior, G3BP1 tiene capacidad de unirse directamente al IRES de HCV. Por ello, era de interés conocer si esta proteína podría inhibir la traducción dirigida por el IRES de HCV. El RNA bicistrónico usado en este ensayo deriva del plásmido p156.1 (Lafuente et al, 2002). Los resultados obtenidos mostraron una inhibición tanto de la traducción dependiente de IRES como dependiente de 5' (Figura 16A, B).

El efecto inhibitor de la traducción de G3BP1 podría deberse a que la traducción previa del RNA de G3BP1 secuestre factores de la traducción, disminuyendo su disponibilidad. Para descartarlo, se realizó la traducción *in vitro* del RNA bicistrónico en presencia de proteína purificada GST-G3BP1. El resultado mostró una fuerte inhibición de la traducción dependiente de 5' (CAT) comparada con una suave inhibición de la traducción IRES dependiente (luc) (Figura 17A). Esto podría ser debido a que la proteína GST-G3BP1 secuestre factores presentes en los RRL que interfiera con la traducción 5' dependiente. Para probar este punto realizamos el experimento con el RNA monocistrónico que expresa un fragmento de la proteína Gemin5 (G5.3) dependiente de IRES. El resultado obtenido fue una inhibición más acentuada de la traducción dependiente de IRES, cuando se usa un RNA monocistrónico en comparación con el RNA bicistrónico (Figura 17B).

Tomando los resultados obtenidos anteriormente, podemos concluir que G3BP1 es un inhibidor de la traducción dependiente de IRES y dependiente de 5' en un sistema de traducción *in vitro*.

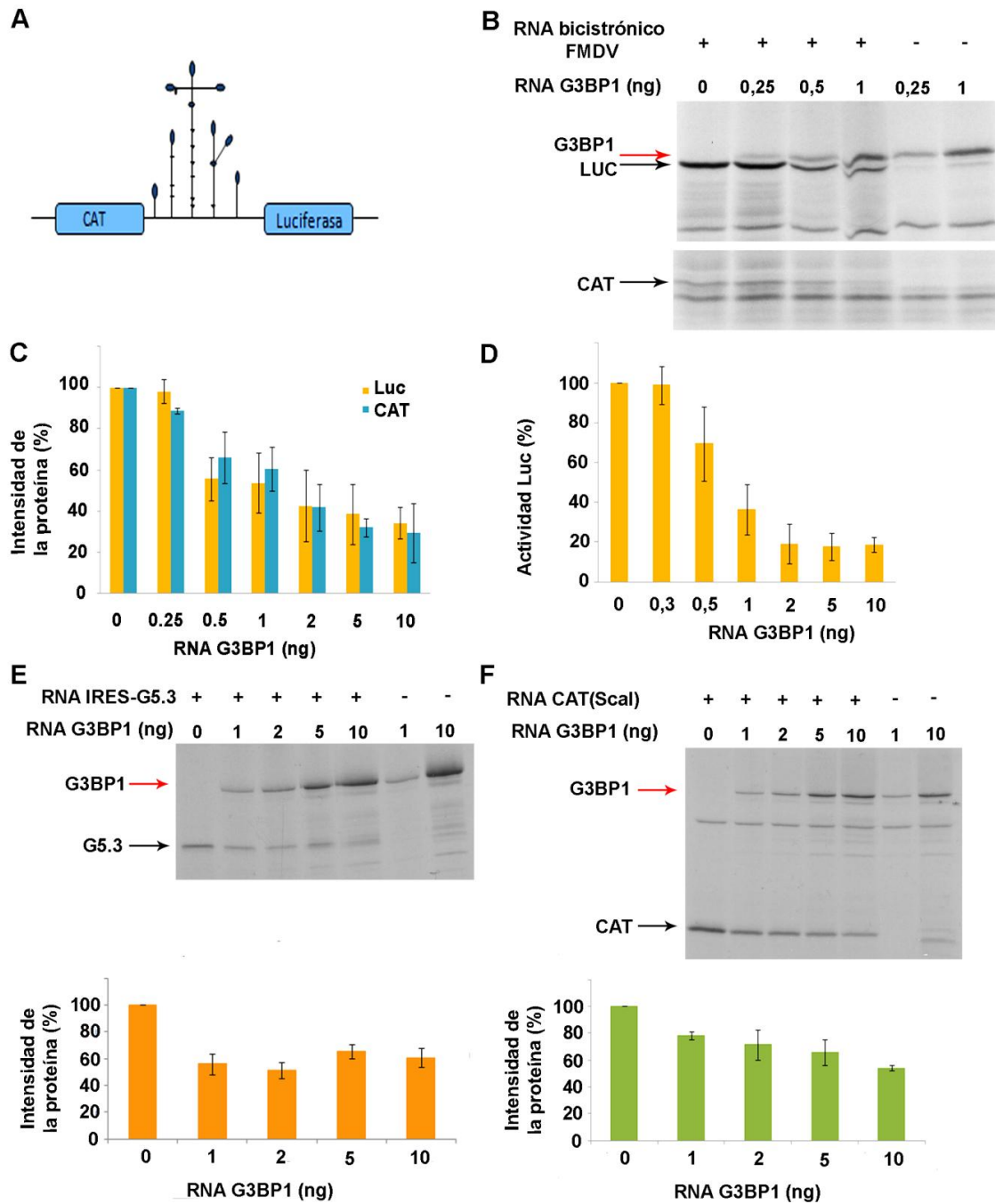


Figura 15. Análisis de la inhibición de la traducción dependiente de IRES o de cap ejercida por la proteína G3BP1. **A)** Representación esquemática del RNA bicistrónico portador del IRES de FMDV **B)** Cantidades crecientes de RNA de G3BP1 (0, 0,25, 0,5 y 1 ng) fueron añadidas a los RRL 15 min antes de la adición de RNA bicistrónico (75 ng). Las proteínas sintetizadas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se detectaron mediante autorradiografía (flechas). **C)** Representación gráfica de la intensidad de bandas de Luc y CAT, normalizada respecto a la intensidad observada en ausencia de G3BP1. Las barras de error indican la SD de al menos tres experimentos independientes. **D)** Representación gráfica de la actividad luciferasa en RRL, normalizada respecto a la actividad Luc en ausencia de G3BP1. **E)** Autorradiografía de la traducción *in vitro* de los RNAs monocistrónicos G5.3 (80 ng) y **F)** CAT (Scal) (50 ng) en presencia de cantidades crecientes del RNA de G3BP1 (0, 1, 2, 5 y 10 ng), añadido 15 min antes que los RNAs monocistrónicos. El producto de las proteínas correspondientes está indicado con flechas. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y la intensidad de las bandas G5.3 y CAT fueron analizadas mediante densitometría y representadas como en C).

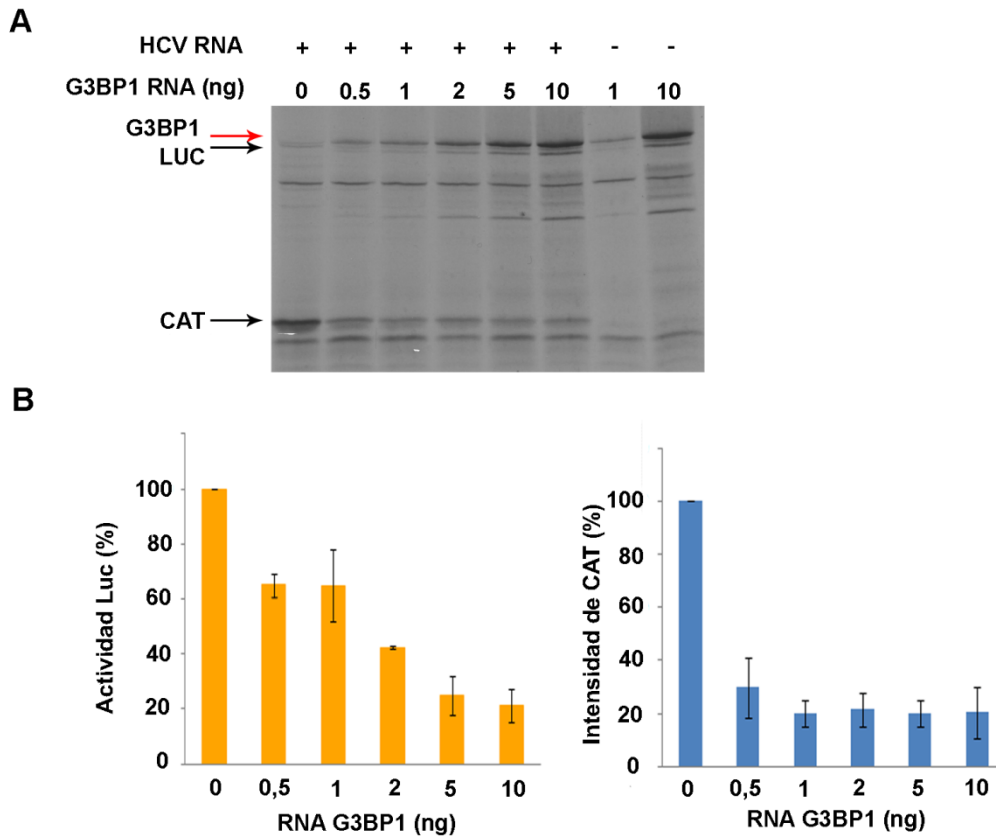


Figura 16. Análisis de la inhibición de la traducción dependiente del IRES de HCV ejercida por la proteína G3BP1. **A)** Cantidades crecientes de RNA de G3BP1 (0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 ng) fueron añadidas a los RRL 15 min antes de la adición de RNA bicistrónico 156.1, portador del IRES de HCV (75 ng). Las proteínas sintetizadas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se detectaron mediante autorradiografía (flechas). **B)** Representación gráfica de la actividad luciferasa y la intensidad CAT de los extractos de RRL. La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la actividad Luc traducida en ausencia de G3BP1. La intensidad de la banda de CAT, se cuantificó como en la Figura 15, apartado C.

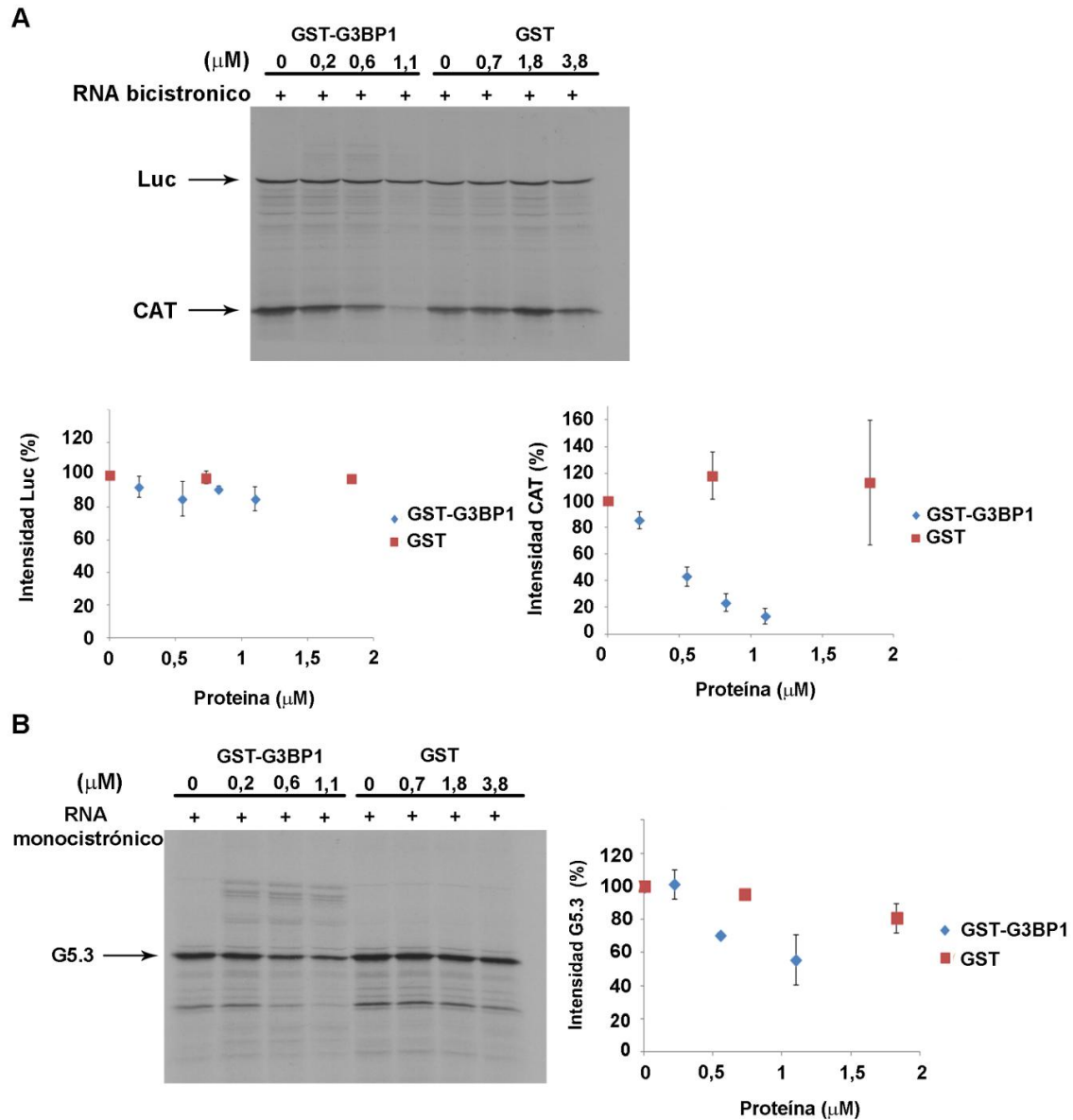


Figura 17. Efecto de la proteína GST-G3BP1 sobre la traducción dependiente de IRES y de cap, *in vitro*. **A)** Cantidades crecientes de la proteína de fusión GST o GST-G3BP1 fueron añadidas a los RRL junto con el RNA bicistrónico (75 ng). Las proteínas sintetizadas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se detectaron mediante autorradiografía (flechas). Representación gráfica de la intensidad de bandas de Luc y CAT, normalizada respecto a la bandas Luc y CAT traducidas en ausencia de proteína de fusión. Las barras de error indican la SD de al menos tres experimentos independientes. **B)** Efecto de cantidades crecientes de la proteína GST o GST-G3BP1 sobre la traducción del RNA monocistrónico G5.3 (75 ng) bajo el control del IRES. Representación gráfica de la intensidad de bandas de G5.3, normalizada respecto a la banda G5.3 traducida en ausencia de proteína de fusión.

2.2 G3BP1 es un inhibidor de la traducción en células en cultivo

Una vez analizado el efecto de G3BP1 sobre la traducción *in vitro*, nos propusimos analizar su efecto sobre la traducción en células BHK-21, mediante transfecciones transitorias de plásmidos bicistrónicos con la secuencia del promotor CMV, y un plásmido que codifica la proteína G3BP1 con el epítipo Xpress, para diferenciar la G3BP1 ectópica de la endógena. Después de 48 h de transfección se recogieron las células y se midió la actividad Luc y CAT del lisado. La sobreexpresión de G3BP1 se analizó mediante Western Blot usando del anticuerpo α -Xpress (Figura 18A). Los resultados demostraron que G3BP1 no inhibió la síntesis de proteínas a concentraciones bajas del plásmido, mientras que a partir de 500 ng de plásmido transfectado inhibió la traducción tanto IRES como cap dependiente (Figura 18B).

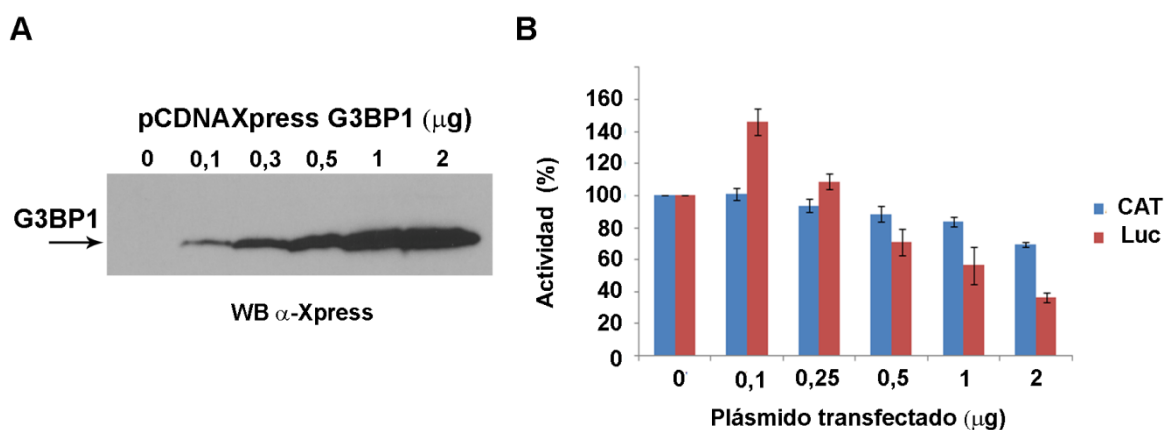


Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de G3BP1 *in vivo* sobre la traducción dependiente de cap e IRES. Transfección de la construcción pcDNA-Xpress-G3BP1 en células BHK-21. **A)** Inmunodetección de la proteína Xpress-G3BP1 sobreexpresada en células BHK-21 durante 48h. La cantidad total de proteína fue cuantificada previamente por el método Bradford, se cargó una cantidad de proteína total de 80 µg en cada carril. **B)** Representación gráfica de la actividad Luc y CAT, normalizada respecto a la actividad Luc y CAT en ausencia de plásmido transfectado.

3. G3BP1 interacciona directamente con PTB y eIF4B

Varias proteínas de unión a RNA interaccionan con los elementos IRES, gobernando el destino del RNA viral en la célula (Pacheco & Martínez-Salas, 2010; White & Lloyd, 2012). En el caso de FMDV se han descrito varias proteínas capaces de interaccionar con esta región del RNA (Pacheco et al, 2009). Los resultados presentados en este trabajo indican que G3BP1 interaccionó directamente con varios dominios. Por tanto, nos preguntamos si

existía la posibilidad de que pudiesen ocurrir interacciones entre G3BP1 y otras proteínas capaces de interactuar con el IRES.

3.1 G3BP1 interactúa directamente con PTB

Se ha descrito que PTB interactúa con el IRES de FMDV (Lopez de Quinto et al, 2001; Niepmann et al, 1997). PTB es una proteína importante durante la traducción dependiente de IRES, ya que PTB estimula la formación del complejo 48S en ensayos de reconstitución *in vitro* (Andreev et al, 2007). Para comprobar si G3BP1 y PTB podían interactuar, se realizaron ensayos de co-purificación de PTB traducida en presencia de Met-S³⁵. El producto de la traducción *in vitro* se utilizó en un ensayo de coprecipitación junto con la proteína GST-G3BP1, purificada a partir de bacterias. En paralelo, se usó GST para tener un control de especificidad. Los resultados demostraron que G3BP1 interactúa con PTB (Figura 19A).

Como ambas proteínas pueden interactuar con los dominios d5 y d1-2 de FMDV, o dIII de HCV, quisimos ver si existía una competición por la unión de ambas proteínas al RNA de los distintos IRES. Para ello, se realizó el ensayo de co-purificación en presencia de RNA correspondiente al IRES completo, d5, d1-2 o dIII de HCV. El único RNA que compitió por la unión de ambas proteínas fue el IRES de FMDV completo (Figura 19A). Por el contrario, en presencia del RNA d5, d1-2 o el dIII de HCV no se observó competición. Este resultado sugiere que la estructura del IRES completo, y no la de sus dominios por separado, es fundamental para que G3BP1 compita con PTB por la unión al IRES de FMDV.

El ensayo anterior todavía dejaba una pregunta sin contestar: ¿son capaces de interactuar ambas proteínas directamente? Para responder a esta pregunta realizamos ensayos de co-purificación entre GST-G3BP1 o GST y la proteína PTB purificada de bacterias. El resultado indicó que ambas proteínas eran capaces de interactuar directamente (Figura 19B).

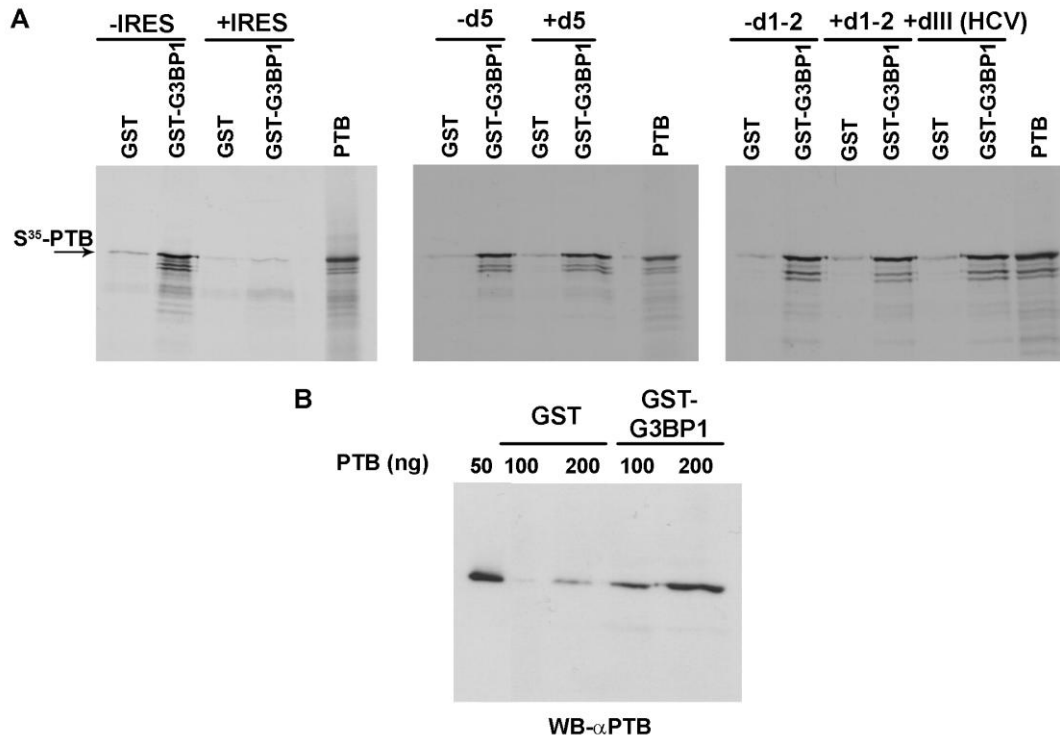


Figura 19. Estudio de la interacción entre G3BP1 y PTB mediante co-purificación. A) Autorradiografía del ensayo de interacción de la proteína S^{35} -PTB (sintetizada en RRL) en presencia de GST o GST-G3BP1 purificadas (4 μ g), durante 1 h a 4°C, en ausencia (-) o presencia (+) de una concentración final 15 nM de los RNAs IRES, d5, d1-2 y dIII. **B)** Interacción de PTB recombinante con G3BP1. Se incubaron las proteínas purificadas PTB (100 y 200 ng) junto con GST o GST-G3BP1 (4 μ g) durante 1 h a 4°C. Las proteínas co-purificadas con GST o GST-G3BP1 retenidas en la resina de glutatión sefarosa se lavaron 3 veces con la solución de unión (ver Materiales y Métodos). Las muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de análisis mediante WB.

3.2 G3BP1 interacciona directamente con eIF4B

eIF4B ha sido descrita como una proteína estimuladora de la actividad IRES que interacciona con el dominio 5 del IRES de FMDV (Lopez de Quinto et al, 2001). Con el objetivo de determinar su capacidad de interactuar con G3BP1 se realizaron ensayos de co-purificación con GST-G3BP1 y eIF4B purificada de bacterias. Los resultados mostraron que estas proteínas interaccionan directamente, existiendo además, una fuerte interacción (Figura 20).

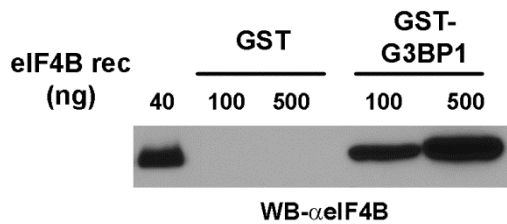


Figura 20. Estudio de la interacción entre G3BP1 y eIF4B mediante co-purificación. Inmunodetección de eIF4B co-purificada con GST-G3BP1 recombinante. Se incubaron las proteínas purificadas eIF4B (100 y 500 ng) junto con GST o GST-G3BP1 (4 µg) durante 1 h a 4°C. Las proteínas co-purificadas con GST o GST-G3BP1 retenidas en la resina de glutatión sefarosa se lavaron 3 veces con la solución de unión. Las muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de análisis mediante WB.

4. G3BP1 interacciona con RBPs en extractos de HEK293

Dado que G3BP1 interaccionó directamente con PTB y eIF4B, nos preguntamos si en un extracto de células HEK293 podríamos observar la interacción de G3BP1 con otras proteínas de unión a RNA. Aunque este experimento no nos permite saber si G3BP1 interacciona directamente con las proteínas ensayadas, nos podría dar información sobre posibles complejos de los que forme parte.

Mediante ensayos de co-purificación con GST y GST-G3BP1 purificadas se observó que G3BP1 interacciona específicamente con PTB y eIF4B en extractos de HEK293 (Figura 21), como se esperaba. El análisis de otras RBPs que interaccionan con el IRES (como DHX9, hnRNPA1 y eIF4G), demostró que G3BP1 interacciona con DHX9 y hnRNPA1, pero no con eIF4G. En este ensayo se usó como control negativo las proteínas tubulina y actina.

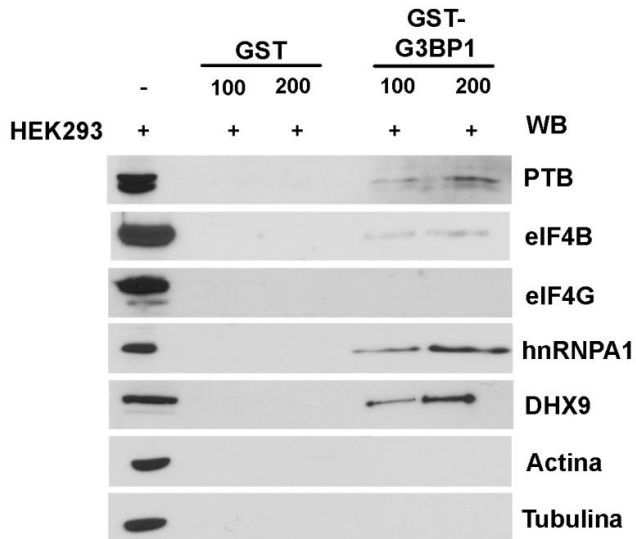


Figura 21. Interacción de G3BP1 con otras RBPs de extractos de células HEK293. Ensayo de co-purificación de GST o GST-G3BP1 (100 y 200 ng) con extractos de células HEK293 (40 µg) durante 1h a 4°C. Tras 3 lavados se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas fueron analizadas mediante WB con los anticuerpos específicos indicados. Se utilizaron actina y tubulina como control de especificidad del ensayo de interacción.

5. Entrecruzamiento de G3BP1 mediante luz UV al IRES de FMDV

Como hemos visto en el apartado 1 de resultados, G3BP1 interacciona directamente con distintos dominios del IRES de FMDV. Además, hemos identificado el sitio preferente de unión de esta proteína en el dominio 5. Nos preguntamos si podríamos demostrar esta interacción mediante entrecruzamiento con luz UV, una técnica que nos abriría las puertas para estudiar la unión de diferentes proteínas al IRES y analizar posibles competiciones entre ellas.

5.1 G3BP1 se entrecruza al d5 del IRES de FMDV

Ensayos de entrecruzamiento con luz UV demostraron que la proteína G3BP1 por si sola se entrecruza con el dominio 5 del IRES de FMDV (Figura 22). Este dominio fue probado en primer lugar porque es el sitio preferente de unión de esta proteína (Figura 10). Como control positivo del ensayo se usó un extracto S10 de células BHK-21 en el que se detecta la unión de eIF4B y PTB (Figura 22, carril 1) (Lopez de Quinto et al, 2001). G3BP1 purificada interaccionó con el d5 del IRES de FMDV de manera dependiente de dosis (Figura 22, carriles 2 y 3). Dicha unión fue competida al añadir RNAc (Figura 22, carriles 4, 5 y 6), como ya demostramos en ensayos de retardo en gel.

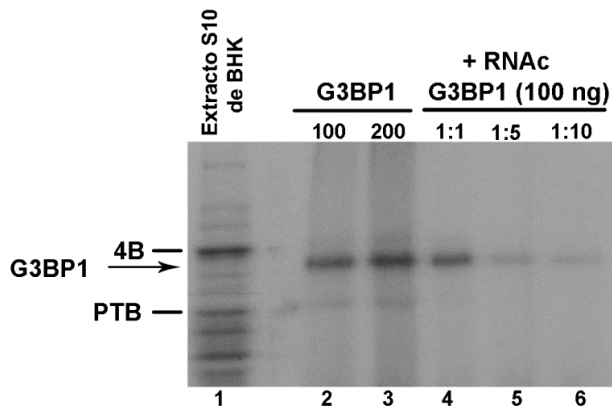


Figura 22. Ensayo de entrecruzamiento de G3BP1 y RNA d5 marcado con P³². Patrón de interacción RNA-proteína de extractos S10 de células BHK-21 (calle 1), o diferentes cantidades (100, 200 ng) de G3BP1 (calles 2 y 3) con RNA d5 marcado con P³² en presencia de RNAc en exceso 1, 5 y 10 veces respecto de la sonda (calles 4, 5 y 6). Los productos resultantes del entrecruzamiento con luz UV, resistentes a la acción de RNasa A, se separaron en SDS-PAGE 10% y se detectaron por autorradiografía.

5.2 G3BP1 desplaza a PTB de su sitio de unión al IRES de FMDV

Una vez confirmado mediante entrecruzamiento con luz UV que G3BP1 era capaz de unirse al d5 del IRES de FMDV, nos preguntamos si G3BP1 afectaría la unión de PTB al IRES. Usando como sonda el IRES marcado uniformemente con P³² comprobamos que ambas proteínas eran capaces de unirse a este. El resultado indicó que G3BP1 compite la unión de PTB, disminuyendo la interacción de esta última al IRES como se refleja en la medida de intensidad de las bandas de PTB es presencia o ausencia de G3BP1 (Figura 23).

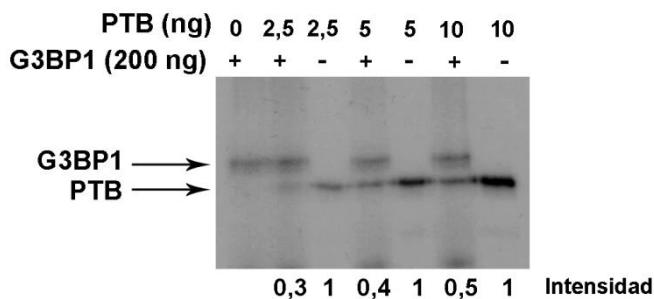


Figura 23. Interacción de PTB y G3BP1 con el RNA del IRES de FMDV en ensayos de entrecruzamiento por luz UV. RNA del IRES de FMDV marcados uniformemente con α -CTP³², se incubaron con las cantidades indicadas de G3BP1 y/o PTB purificadas. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE 10% y se detectaron mediante autorradiografía. La intensidad de las bandas representa la media de dos experimentos independientes, normalizada respecto a la intensidad de las bandas de PTB en ausencia de G3BP1.

6. La proteasa 3C hidroliza G3BP1

El genoma de los picornavirus codifica en su genoma proteasas que catalizan el procesamiento de la poliproteína viral durante la infección, además de varios factores del hospedador, favoreciendo la síntesis de proteínas virales. En células infectadas por PV, G3BP1 comienza a hidrolizarse a tiempos medios de la infección y a tiempos tardíos su hidrólisis es completa (White et al, 2007). En nuestro laboratorio hemos descrito que la infección por FMDV hidroliza varias proteínas celulares como eIF4GI, eIF3, PTB o Gemin5, entre otras (Piñeiro et al, 2012; Rodríguez-Pulido et al, 2007).

Nos propusimos conocer si G3BP1 era hidrolizada en células infectadas por FMDV. Para ello células IBRS2 fueron infectadas con FMDV. Los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot usando el anticuerpo anti-G3BP1 a diferentes tiempos de la infección. En paralelo se realizaron infecciones con otros picornavirus. Como se observa en la Figura 24A, solo en células infectadas con FMDV, pero no con EMCV o el virus de la enfermedad vesicular del cerdo (SVDV) se produjo la hidrólisis de G3BP1. La hidrólisis de G3BP1 comenzó 2 horas post-infección (hpi) y fue completa a 3 hpi, dando lugar a un fragmento de 55 kDa, correspondiente al extremo amino-terminal. El fragmento correspondiente al extremo carboxilo-terminal fue indetectable con el anticuerpo α -G3BP1.

El genoma de FMDV codifica 2 proteasas, Lb y 3C. Para averiguar cuál de las dos proteasas era la responsable del corte de G3BP1, realizamos expresiones transitorias en células BHK21 de ambas proteasas. Los plásmidos que codifican estas proteasas se transcriben bajo el control del promotor T7. Para realizar este experimento, se realizó una infección con un Virus Vaccinia que expresa la polimerasa T7. El resultado obtenido se muestra en la Figura 24B. La expresión de la proteasa Lb no indujo el corte de G3BP1. Como control positivo de este experimento se analizó la hidrólisis de eIF4GI para confirmar que la proteasa Lb era activa (Figura 24B).

El análisis de G3BP1 en células que expresan 3C mostró que la proteína G3BP1 endógena desaparece a medida que aumentamos la cantidad de plásmido transfectado (Figura 24B). Por tanto, a la vista de estos resultados, podemos decir que G3BP1 se hidroliza a tiempos

medios y tardíos tras la infección por FMDV, y que la proteasa 3C es la responsable de la degradación de G3BP1.

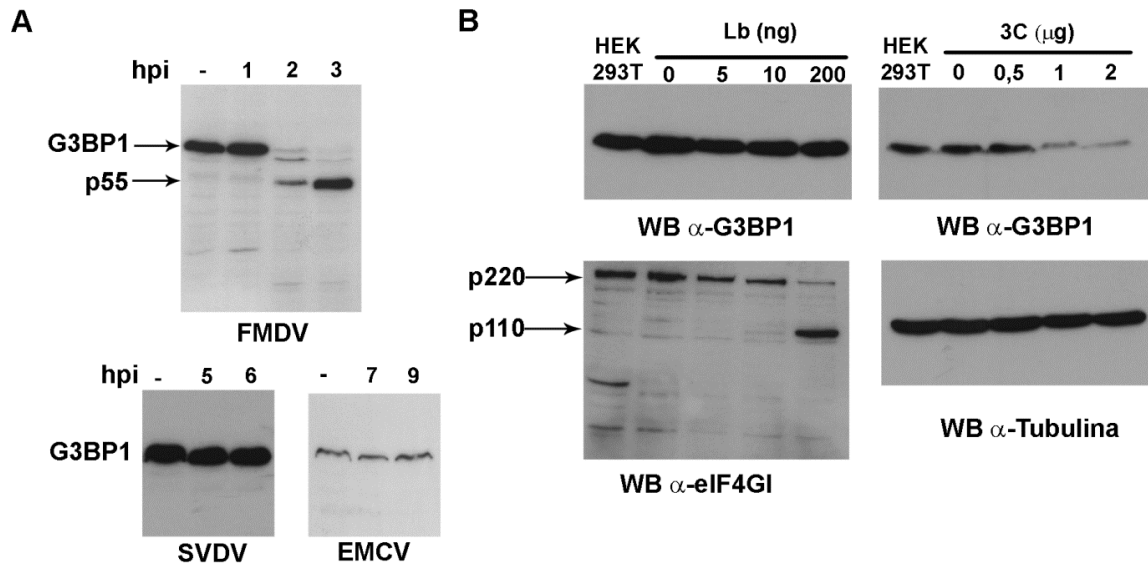


Figura 24. Proteólisis de G3BP1. **A)** Inmunodetección de G3BP1 en células infectadas por FMDV, SVDV o EMCV. Los lisados celulares se recogieron a las horas (hpi) indicadas. Las flechas indican la proteína endógena y el producto final proteolizado. **B)** Inmunodetección de G3BP1 y eIF4GI. Las cantidades transfectadas de los plásmidos que expresan 3C o Lb se indican en cada caso. Las flechas señalan la proteína endógena o su producto de degradación. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

7. El fragmento amino terminal y carboxilo terminal de G3BP1 inhiben la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap

Como hemos visto en el apartado anterior, la proteína G3BP1 se proteoliza en células infectadas con FMDV, como sucede en la infección por PV (White et al, 2007). La hidrólisis de G3BP1 produce un fragmento de 55 kDa y otro de 17 kDa. EL fragmento de 55 kDa corresponde al extremo amino terminal (Nt), mientras que el fragmento carboxilo terminal (Ct) de 17 kDa presenta el dominio de unión al RNA (Figura 6).

7.1 Los fragmentos Nt y Ct de G3BP1 son inhibidores de la traducción *in vitro*

Para determinar si los fragmentos Nt y Ct de G3BP1 tenían el potencial de inhibir la traducción dependiente de IRES y de cap, añadimos las proteínas recombinantes GST-NtG3BP1 y GST-CtG3BP1 al sistema de RRL mientras se traduce el RNA bicistrónico.

Los resultados obtenidos usando un RNA bicistrónico indicaron que ningún fragmento tuvo la capacidad de inhibir la traducción dependiente de IRES (luc) (Figura 25A). A continuación, se analizó la capacidad de inhibición de ambos fragmentos con un RNA monocistrónico en el que la traducción estuviese bajo el control del IRES de FMDV. Al igual que para G3BP1 (Figura 17), la inhibición de la traducción dependiente de IRES fue más notable en el caso de usar un RNA monocistrónico (Figura 25B).

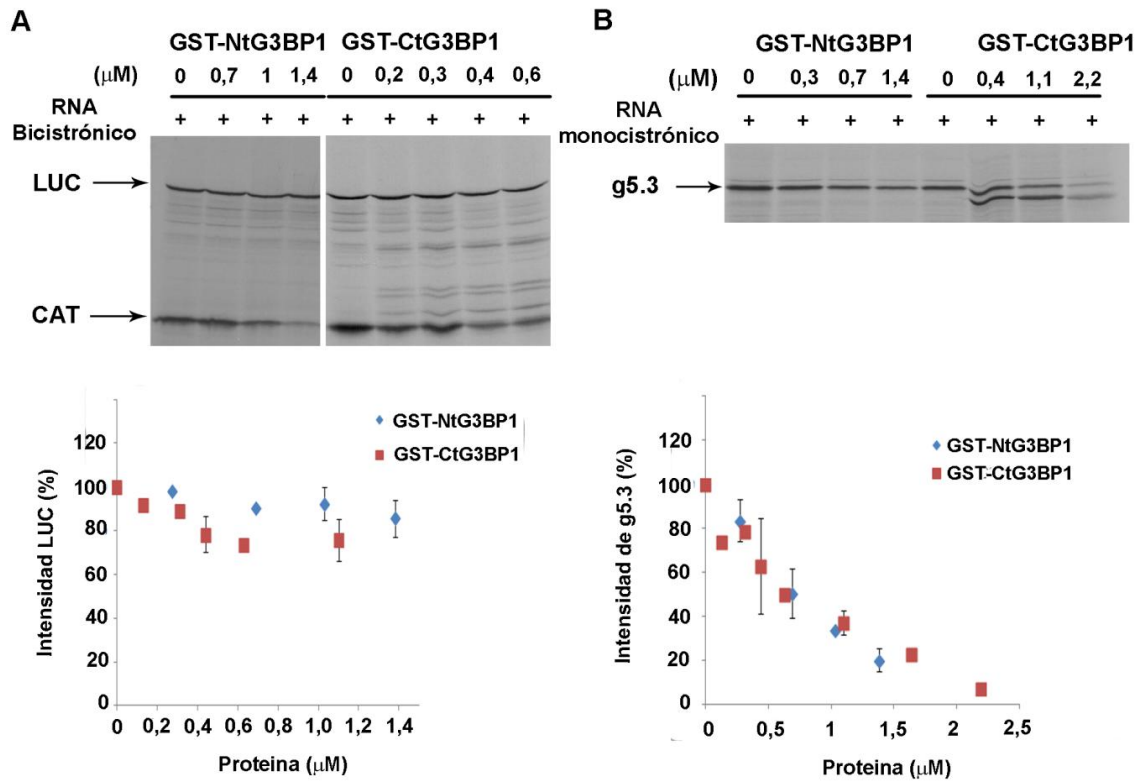


Figura 25. Efecto de los fragmentos Nt- y Ct-G3BP1 purificados sobre la traducción dependiente de IRES y de cap. A) Cantidades crecientes de la proteína de fusión GST-NtG3BP1 o GST-CtG3BP1 fueron añadidas a los RRL 15 min antes de la adición de RNA bicistrónico (75 ng). Las proteínas sintetizadas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se detectaron mediante autorradiografía (flechas). Representación gráfica de la intensidad de bandas de Luc y CAT, normalizada respecto a la bandas Luc y CAT traducidas en ausencia de proteína de fusión. Las barras de error indican la SD de al menos tres experimentos independientes. **B)** Efecto de cantidades crecientes de la proteína de fusión GST-NtG3BP1 o GST-CtG3BP1 sobre la traducción del RNA monocistrónico de G5.3 (75 ng) bajo el control del IRES. Representación gráfica de la intensidad de bandas de G5.3, normalizada respecto a la banda G5.3 traducida en ausencia de proteína de fusión.

7.2 Los fragmentos Nt y Ct de G3BP1 son inhibidores de la traducción *in vivo*

Se realizó el mismo abordaje que para la proteína completa G3BP1, llevando a cabo expresiones transitorias de un plásmido bicistrónico, junto con plásmidos que codifican los fragmentos XpressNt-G3BP1 y XpressCt-G3BP1. Después de 48 h de transfección, se recogieron las células y se midió la actividad Luc y CAT de los lisados. La sobreexpresión de los fragmentos de G3BP1 se analizó mediante Western Blot usando anticuerpo anti-Xpress. En el caso de la traducción dependiente de IRES, los resultados obtenidos fueron que el fragmento Nt inhibió la traducción a partir de cantidades de 1 µg de plásmido transfectado. A concentraciones menores no tuvo efecto. En el caso de Ct-G3BP1, a partir de concentraciones superiores a 500 ng de plásmido transfectado se observó la inhibición de la traducción dependiente de IRES, siendo su efecto mayor que la del fragmento Nt. A concentraciones bajas (100 ng) no tuvo efecto ninguno de los fragmentos (Figura 26B). En la traducción dependiente de cap, el efecto es más suave y comienza a verse una ligera inhibición a partir de la cantidad de 1 µg para ambos fragmentos (Figura 26A, B).

Por tanto, podemos decir que los fragmentos Nt-G3BP1 y Ct-G3BP1 tienen la capacidad de inhibir la traducción dependiente de IRES y cap *in vivo*. La inhibición de la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap es similar, salvo a la concentración de 2 µg, donde la inhibición dependiente de IRES es más fuerte. El efecto del fragmento Ct es moderadamente más fuerte que el fragmento Nt.

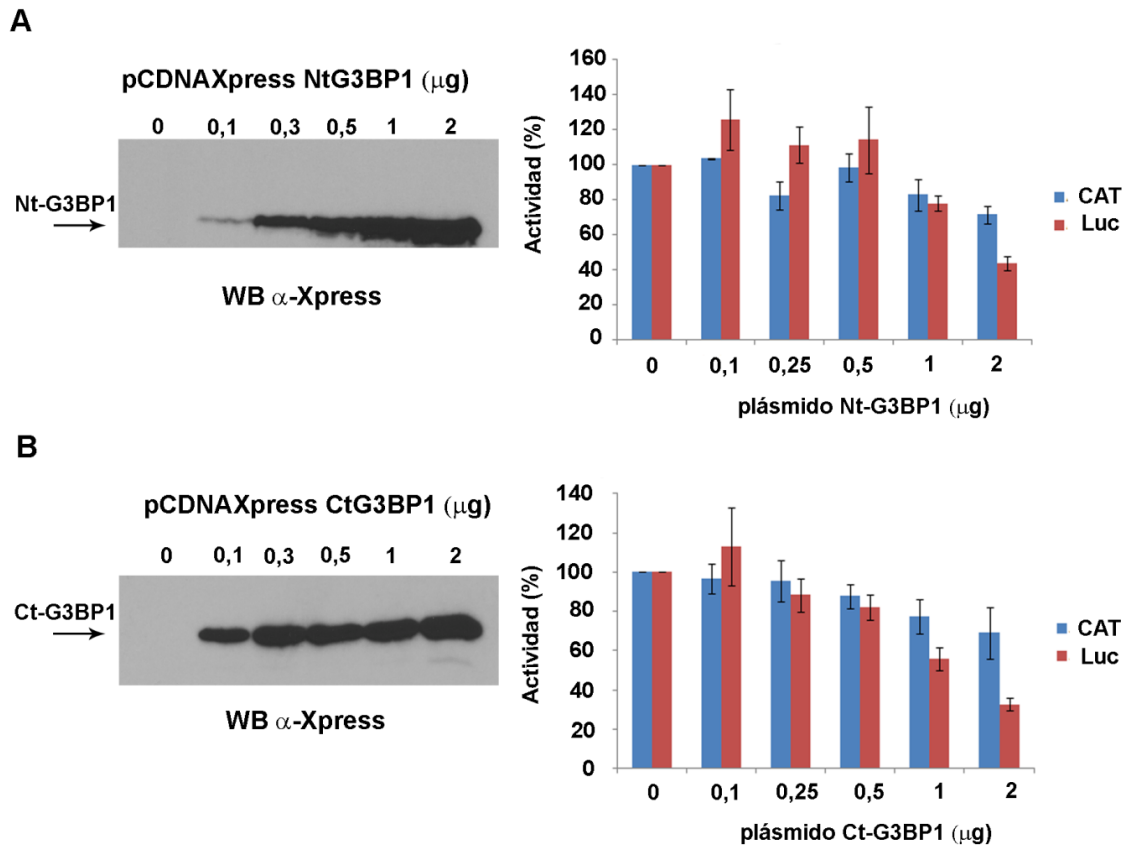


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de los fragmentos Nt-G3BP1 y Ct-G3BP1 *in vivo* sobre la traducción dependiente de cap e IRES. **A)** Transfección de la construcción pcDNA-Xpress-Nt-G3BP1 en células BHK-21. Inmunodetección de la proteína Xpress-NtG3BP1 sobreexpresada en células BHK-21 a 48 h. La cantidad total de proteína fue cuantificada previamente por el método Bradford, se cargó una cantidad de proteína total de 80 μg en cada carril. Representación gráfica de la actividad Luc y CAT, normalizada respecto a la actividad Luc y CAT en ausencia de plásmido transfectado. Las barras de error indican la SD de al menos tres experimentos independientes. **B)** Transfección de la construcción pcDNA-Xpress-Ct-G3BP1 en células BHK-21. Inmunodetección de la proteína Xpress-CtG3BP1 sobreexpresada en células BHK-21 durante 48 h. Representación gráfica como en A).

8. El fragmento Ct-G3BP1 interactúa directamente con PTB y eIF4B

Para determinar la capacidad de los fragmentos de G3BP1 de interactuar con otras proteínas, y así poder entender mejor el mecanismo por el que inhiben la traducción, se generaron proteínas de fusión con la proteína GST, para realizar experimentos de co-purificación con ambos fragmentos.

Primero se realizó un ensayo en el que PTB se sintetizó *in vitro* en presencia de Met-S³⁵. A continuación, el producto de la traducción se sometió a un ensayo de co-purificación junto

con la proteína GST, GST-NtG3BP1 y GST-CtG3BP1. El resultado indicó que únicamente el fragmento Ct-G3BP1 interacciona con PTB (Figura 27A). Para ver si existía una competición por la unión de ambas proteínas al RNA del IRES de FMDV, se realizaron ensayos de co-purificación en presencia del IRES completo. Los resultados indicaron que el RNA del IRES compite por la unión de ambas proteínas (Figura 27A).

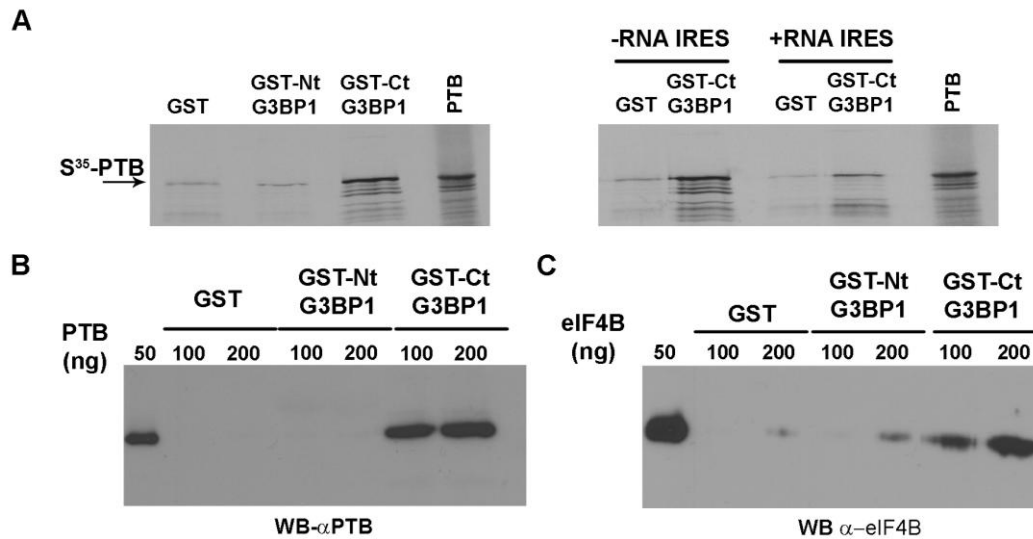


Figura 27. Estudio de la interacción entre los fragmentos Nt- y Ct-G3BP1, y PTB o eIF4B mediante co-purificación. A) Autorradiografía del ensayo de interacción de la proteína S^{35} -PTB (sintetizada en RRL) en presencia de GST o GST-G3BP1 purificadas (4 μ g), durante 1h a 4°C en ausencia (-) o presencia (+) del RNA del IRES (15 nM). **B)** Interacción de PTB con Nt-G3BP1 y Ct-G3BP1. Se incubaron las proteínas purificadas PTB (100 y 200 ng) junto con GST o GST-NtG3BP1 y GST-CtG3BP1 (4 μ g) durante 1h a 4°C. Las proteínas co-purificadas con GST o GST-NtG3BP1 y GST-CtG3BP1 retenidas en la resina de glutatión sefarosa se lavaron 3 veces con la solución de unión (ver Materiales y Métodos). Las muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de WB. **C)** Interacción de eIF4B con Nt-G3BP1 y Ct-G3BP1. Se incubaron las proteínas purificadas eIF4B (100 y 200 ng) junto con GST o GST-NtG3BP1 y GST-CtG3BP1 (4 μ g) durante 1h a 4°C. Las proteínas co-purificadas con GST o GST-NtG3BP1 y GST-CtG3BP1 retenidas en la resina de glutatión sefarosa se lavaron 3 veces con la solución de unión. Las muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de WB.

Seguidamente, teníamos que resolver si dicho fragmento mantenía la capacidad de unirse directamente a PTB. Para contestar esta cuestión realizamos un ensayo de co-purificación con GST-CtG3BP1 y PTB purificadas. El resultado demostró que el fragmento Ct-G3BP1 mantenía la capacidad de interactuar directamente con PTB (Figura 27B).

El mismo abordaje experimental se realizó usando las proteínas purificadas GST, GST-NtG3BP y GST-CtG3BP con eIF4B, con el fin de confirmar la capacidad de unión de los

distintos fragmentos de G3BP1. Como se observa en la Figura 27C, únicamente el fragmento Ct tuvo la capacidad de interactuar directamente con la proteína eIF4B. En resumen, los resultados demuestran que la proteína G3BP1 interactúa con PTB y eIF4B a través de su extremo Ct.

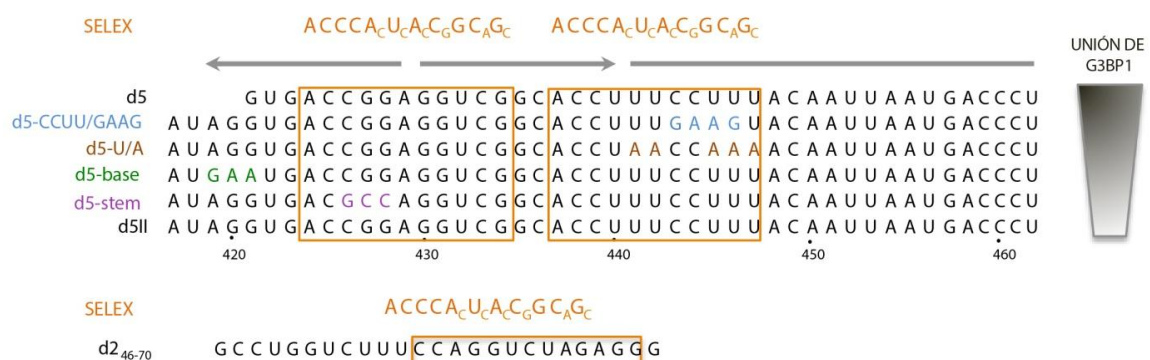
DISCUSIÓN

1. La interacción de G3BP1 con el IRES permite flexibilidad de secuencia.

G3BP1 se identificó asociada al d5 del IRES de FMDV en un estudio de riboproteómica (Pacheco et al, 2008). Sin embargo, este estudio no determinó si la unión es directa, ya que otros RNAs o RBPs podrían estar mediando esta interacción. Los estudios que hemos realizado en este trabajo muestran que G3BP1 puede unirse directamente a varios dominios del IRES de FMDV y, al menos, al dIII del IRES de HCV.

Hasta el momento los datos disponibles sobre la unión de G3BP a RNA proceden de resultados de SELEX (Tourrière et al, 2001) y de CLIP (Ray et al, 2013). En el caso del SELEX, la comparación de la secuencia consenso con secuencias del IRES de FMDV (Tabla 3), muestra que al menos existe un 50% de coincidencia en los dominios d1-2 y d5. En la publicación de Tourrière et al (2001) se detalló una lista de RNAs que contienen secuencias semejantes a las obtenidas por SELEX (Figura 7B), algunas de ellas se localizan en regiones no codificantes, 5' o 3'UTR, del mRNA. Sin embargo, la relevancia de estas secuencias para la interacción de G3BP1 no se ha estudiado.

Tabla 3. Alineamiento de secuencias de distintos dominios y mutantes del IRES de FMDV con la secuencia consenso obtenida SELEX.



La unión de una proteína a un RNA no depende únicamente de la secuencia primaria. La estructura secundaria del RNA puede determinar la accesibilidad de las proteínas al RNA. Utilizando sondas correspondientes a la región de cadena sencilla y la horquilla del d5,

hemos demostrado que la zona preferente de unión de G3BP1 se localiza en la zona de cadena sencilla. Sin embargo, la capacidad de unión de G3BP1 al d5 completo fue superior a la región de cadena sencilla. Por tanto, la horquilla del d5 estabiliza la unión de G3BP1 al IRES de FMDV. Este resultado demostró que, aún teniendo los mismos nucleótidos accesibles, la estructura secundaria influye en la capacidad de unión de la proteína al RNA.

El estudio mutacional sobre el RNA d5II se representa en la Figura 28. La comparación de la capacidad de unión de G3BP1 a d5II o d5 (en el que están ausentes los nt 415-421, por lo que los nt de la base del d5 estarían accesibles) produjo una diferencia brusca en la capacidad de unión de G3BP1 a estos RNAs (Figura 10 y Figura 14). Comparando el RNA d5II con el mutante d5II-base, en el que se predice que los nt de la base estarían desemparejados, y con d5II-stem, se observó que G3BP1 presenta mayor capacidad de unión al RNA d5II-base que al RNA d5II o d5II-stem. En conjunto, los resultados obtenidos en la capacidad de unión de G3BP1 al d5 y d5II, o d5II-base y d5II, o d5II-stem, confirman que la región desapareada de la base del d5 determina la capacidad de unión de G3BP1 al RNA.

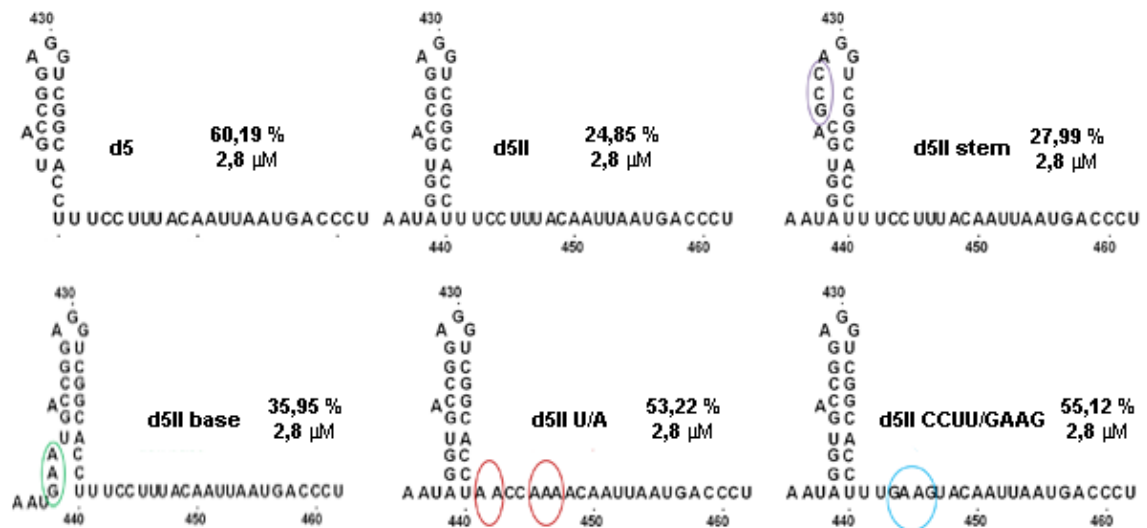


Figura 28. Esquema de la estructura secundaria de los diferentes mutantes del d5. Los nt marcados con óvalos, indican las mutaciones respecto al d5II.

En los mutantes d5II-U/A y d5II-CCUU/GAAG se sustituyeron las pirimidinas por purinas para analizar el efecto que tenía sobre la capacidad de unión de G3BP1. En la secuencia consenso del SELEX hay un alto número de pirimidinas; por tanto, podría suceder que la afinidad de G3BP1 por estos mutantes fuera menor que por el d5II.

Además, el alto número de pirimidinas en el consenso obtenido por SELEX coincide con la conservación de nt en el tramo de pirimidinas en el IRES de aislados de FMDV. A pesar de las coincidencias, los resultados mostraron que la capacidad de unión de G3BP1 a los mutantes d5II-U/A y d5II-CCUU/GAAG es mayor que al d5II (Figura 14), indicando que las pirimidinas no son esenciales para la interacción de G3BP1 con el IRES.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios mutacionales realizados sobre el d5 del IRES, así como su capacidad de unión a otros dominios presentes en el IRES de FMDV y HCV, han demostrado que G3BP1 no reconoce una secuencia específica en el RNA. Teniendo en cuenta el conjunto de estos resultados podemos afirmar que G3BP1 podría tener preferencia por regiones del RNA de cadena sencilla que se encuentren cerca de horquillas o zonas apareadas, las cuales pueden estabilizar la unión de G3BP1 al RNA. Además, G3BP1 permite flexibilidad de secuencia para unirse al RNA. Por último, estos resultados demostraron que el sitio preferente de unión reside en el d5 del IRES entre los nucleótidos ACCUUUCCUUU (437-447).

Debido a la variedad de procesos celulares en los que interviene G3BP1, como oncogénesis (Irvine et al, 2004; Winslow et al, 2013; Zhang et al, 2012), metabolismo del RNA (Atlas et al, 2004; Gallouzi et al, 1998; Tourrière et al, 2001), ensamblaje de SGs (Anderson & Kedersha, 2006; Reineke et al, 2012; Tourrière et al, 2003), desarrollo embrionario de invertebrados (Pazman et al, 2000), ubiquitinación (Cohen et al, 2003a; Cohen et al, 2003b; Soncini et al, 2001), ciclo vital de diversos virus (Panas et al, 2012; Reineke & Lloyd, 2013; White et al, 2007; Yi et al, 2011), es esperable que el reconocimiento de secuencias de RNA sea muy flexible.

Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que G3BP1 es capaz de unirse al dIII del IRES de HCV, mediante estudios de retardo en gel de G3BP1 con el dIII de HCV (Figura 12A). Otros autores han demostrado la unión de G3BP1 a otras regiones del RNA de HCV durante la replicación de este virus (Yi et al, 2006), pero no se había descrito su unión al IRES de HCV. Posteriormente, en ensayos de competición se observó que el RNAc total compite eficientemente por la unión al d5 o al d1-2; sin embargo, es necesaria una cantidad 10 veces mayor para competir la unión al dIII de HCV (Figura 12B). Estos resultados junto con los retardos en gel demostraron que la unión de G3BP1 al dIII de HCV es más fuerte que al d5 de FMDV.

El hecho de que la capacidad de unión de G3BP1 al dIII de HCV sea tan fuerte, sugiere que, aparte del papel que se ha sugerido que juega en el proceso de replicación del virus (Yi et al, 2011), pueda tener otras funciones en el proceso de traducción o replicación. A favor de esta posibilidad, en este trabajo se ha demostrado que G3BP1 es capaz de inhibir la síntesis de Luc *in vitro* cuando esta se traduce bajo el control del IRES de HCV (Figura 16).

2. G3BP1 desplaza a PTB de su sitio de unión al IRES de FMDV.

La región preferente de unión de G3BP1 al IRES de FMDV comprende la región rica en pirimidinas de la región de cadena sencilla del d5, que coincide con el sitio de unión de la proteína PTB. En el transcrito d2 existe otra región rica en pirimidinas (Figura 10A, Tabla 3), a la que G3BP1 también tiene la capacidad de unirse, tanto en ensayos de entrecruzamiento por luz UV como en retardo en gel. Mediante experimentos de entrecruzamiento por luz UV estudiamos la relación que existe en la unión de G3BP1 y PTB al IRES. La presencia de G3BP1 afecta negativamente a la unión de PTB al IRES, siendo menor este efecto cuando aumentamos la cantidad de PTB (Figura 23). Con los datos disponibles, no podemos deducir si la unión de PTB se reduce en un determinado dominio mientras que en otro se mantiene, o bien que netamente se reduzca su unión en ambos dominios.

La interacción de G3BP1 puede causar cambios estructurales en el IRES, que resulten en una competición entre G3BP1 y PTB para unirse al RNA del IRES. Esta posibilidad será estudiada mediante otros abordajes experimentales (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE) o radical hidroxilo).

Por otro lado, se ha comprobado que PTB causa cambios conformacionales en los IRES de picornavirus (Kafasla et al, 2011; Kafasla et al, 2009; Yu et al, 2011). La unión de PTB al IRES de EMCV promueve un acercamiento de d4 y d3 estabilizando la estructura terciaria del IRES en una conformación más compacta (Yu et al, 2011). Si la unión de G3BP1 reduce la capacidad de unión de PTB al IRES de FMDV, podría tener consecuencias en el ensamblaje del complejo de pre-iniciación y por lo tanto, afectar a los niveles de traducción del IRES de FMDV, como discutiremos más adelante.

3. G3BP1 es un represor de la traducción.

El papel de G3BP1 en la regulación de la expresión de ciertos mRNAs se ha estudiado en detalle. En el caso del RNA que codifica la proteína periférica de mielina (PMP22) afecta a la progresión del cáncer de mama (Winslow et al, 2013); en el caso del mRNA de Tau regula su expresión temporal junto con otras proteínas (Atlas et al, 2004), y en el mRNA β -F1 ATPasa regula negativamente su expresión (Ortega et al, 2010). Por otro lado, la proteína G3BP1 presenta actividad RNasa débil, ejerciendo un control sobre la expresión del mRNA de c-myc que resulta en su acumulación en determinadas etapas del ciclo celular (Gallouzi et al, 1998; Tourrière et al, 2001).

Los datos que presentamos en este trabajo muestran que G3BP1 es un inhibidor de la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap, tanto *in vivo* como *in vitro* (Figuras 15-18). El uso de RNAs bicistrónicos y monocistrónicos descarta la posibilidad de que la inhibición de un cistron sea consecuencia de la inhibición indirecta del otro (Andreev et al, 2009).

La inhibición de la traducción de estos RNAs fue parcial, y podría ser debido a varias causas: a) G3BP1 podría secuestrar eIFs o RBPs necesarios para que se produzca la traducción de manera eficiente. En nuestro caso hemos demostrado que G3BP1 interacciona directamente con PTB y eIF4B. b) G3BP1 podría secuestrar temporalmente RNAs formando algún tipo de agregado, impidiendo que la maquinaria traduccional pueda interactuar con estos RNAs, como se ha descrito para el RNA del HIV-1 (Cobos Jimenez et al, 2015). c) G3BP1 podría inferir cambios conformacionales en la estructura del RNA evitando que la maquinaria traduccional reconozca el IRES. d) Finalmente, podría suceder la contribución parcial de cada una de las causas anteriores.

La depleción o falta de algún ITAF (PTB) disminuye la formación de los complejos de pre-iniciación (Andreev et al, 2007; Niepmann et al, 1997). Como hemos mencionado anteriormente, se ha demostrado que PTB estabiliza la conformación tridimensional del IRES de picornavirus (Kafasla et al, 2011; Kafasla et al, 2009). Por tanto, si la interacción de G3BP1 desplaza la unión de PTB al IRES de FMDV (Figura 23), podría alterar las funciones de PTB como chaperona, resultando en una conformación diferente del RNA, y

en consecuencia afecta al ensamblaje del complejo de pre-iniciación y reduciendo la tasa de traducción.

Por otro lado, la presencia del RNA del IRES (15 nM) disminuye la interacción entre G3BP1 y PTB (Figura 19). Sin embargo, no se observa competición en presencia de los dominios del IRES con los que también interaccionan estas proteínas (d5, el d1-2 o el dIII de HCV). Estos resultados sugieren que la estructura tridimensional del IRES es importante en la competición de ambas proteínas por su unión a este RNA, y además, que la interacción de ambas proteínas con el IRES de FMDV ocurre preferentemente respecto de la interacción entre ellas.

La proteína PTB posee 4 dominios RRM (Vitali et al, 2006). La capacidad de unión de estos dominios al RNA es diferente; el dominio RRM3 presenta la unión más fuerte al d1-2 del IRES de EMCV y el RRM4 una unión más débil a los dominios 4-5 (Song et al, 2005). En nuestro trabajo se ha demostrado que la interacción entre G3BP1 y PTB se produce a través del extremo Ct de G3BP1 (Figura 27), que contiene dos dominios de interacción con el RNA (RRM y RGG) consecutivos. Los resultados obtenidos sugieren que la interacción de G3BP1 con PTB podría estar mediada por los dominios RRM de ambas proteínas, apoyando una nueva función de este tipo de dominio en interacciones proteína-proteína (Rajyaguru & Parker, 2012).

Con estos resultados proponemos que el efecto de G3BP1 sobre la traducción dependiente de IRES podría ser debido a dos causas diferentes. La unión de G3BP1 al IRES de FMDV de manera preferente a la unión con PTB, podría modificar la estructura tridimensional del IRES en una conformación poco eficiente para el ensamblaje del complejo pre-iniciación. En el caso de que PTB esté unida al IRES, la interacción posterior de PTB con G3BP1 mediante el dominio RRM, desplazaría a PTB del RNA y, de este modo, favorecería la interacción entre G3BP1 y el IRES de FMDV (Figura 29).

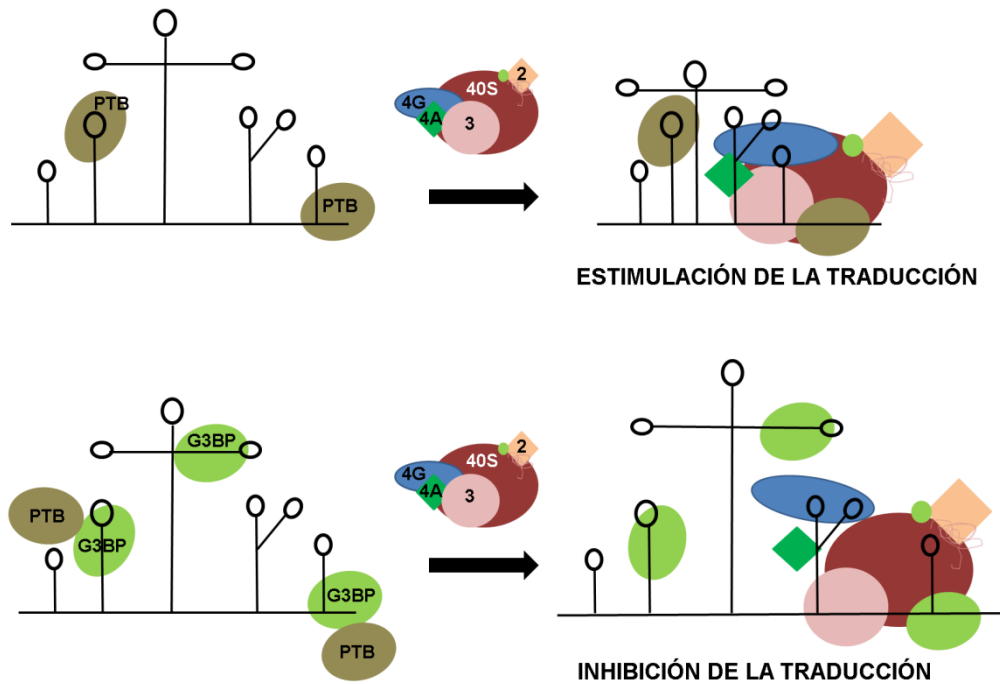


Figura 29. Mecanismo de inhibición de la traducción dependiente de IRES ejercido por G3BP1. Ver discusión en el texto

El factor de inicio de la traducción 4B estimula la traducción dependiente de IRES y dependiente de cap (Dmitriev et al, 2003; Mitchell et al, 2010). En nuestro trabajo hemos demostrado que G3BP1 interacciona directamente con este factor mediante su extremo carboxilo. Como hemos propuesto anteriormente, G3BP1 podría estar interaccionando con otras proteínas necesarias para el inicio de la traducción, secuestrando temporalmente estos factores. Además, la capacidad de reconocimiento de distintas secuencias de RNA por parte de G3BP1 y su capacidad de autoagregación (Tourrière et al, 2003) favorece que se formen agregados de RNPs, causando que el inicio de la traducción se inhiba parcialmente. A favor de esta posibilidad se ha descrito que proteínas con dominios RGG interaccionan con eIF4G (Rajyaguru & Parker, 2012). Como consecuencia, inhiben la traducción al formar un complejo con eIF4G, e interfiriendo con el reclutamiento de los complejos 43S al no poderse formar el complejo eIF4E/eIF4G.

4. G3BP1 es proteolizada en células infectadas por picornavirus

En este trabajo se muestra que G3BP1 es proteolizada en células IBRS2 durante la infección por FMDV. Debido a la zona de reconocimiento del anticuerpo que se ha utilizado, sólo podemos detectar un fragmento de 55 kDa resultante de dicha proteólisis. La proteólisis de G3BP1 comienza 2 hpi y se completa 3 hpi (Figura 24). Estos datos coinciden con los presentados por (White et al, 2007) en células infectadas por PV. Durante la infección por FMDV se proteolizan varios eIFs, como eIF4GI (Gradi et al, 1998), eIF4A (Belsham et al, 2000), eIF3, PTB y PABP (Rodríguez-Pulido et al, 2007). En conjunto, la hidrólisis de estos factores causa una inhibición de la traducción dependiente de cap en favor de la traducción dependiente de IRES.

La inhibición de la traducción por diferentes estímulos desencadena la formación de SGs en la célula. La formación de SGs se modula en células infectadas por virus de diferentes familias, sugiriendo que estos agregados de RNP pueden tener una función antiviral (White & Lloyd, 2012). La infección por PV desencadena la formación de SGs, al mismo tiempo que se detecta la proteólisis de los factores eIF4GI y eIF4GII, y antes de la detección de eIF2 α fosforilado (Mazroui et al, 2006). Por otra parte, G3BP1 es una proteína importante en el ensamblaje de SGs y su rotura durante la infección podría llevar a una inhibición del ensamblaje de los SGs (White et al, 2007). Este hecho sugiere que la rotura de esta proteína favorece que se complete el proceso de replicación viral al inhibirse la formación de SGs.

Durante la infección por FMDV se produce la proteólisis de eIF4GI y G3BP1. La rotura de eIF4GI ocurre a tiempos de infección anteriores a los de la rotura de G3BP1. En células infectadas por PV, primero se produce la inhibición de la traducción dependiente de cap por la proteólisis de eIF4GI, a la vez que comienza la formación de SGs; un tiempo después se observa la proteólisis de G3BP1 y la desaparición de SGs en la célula. Este hecho sugiere que para que se complete el ciclo replicativo de PV, no es suficiente con la inhibición dependiente de cap, y es fundamental el desensamblaje de SGs. De forma semejante, la formación de SGs podría estar limitando la disponibilidad de factores necesarios para la traducción del RNA de FMDV, y la de otros RNAs de manera independiente de cap para revertir la infección (White & Lloyd, 2012). La rotura de G3BP1 podría revertir este proceso, liberar ITAFs que se encuentran en SGs y así, favorecer que la infección por FMDV progrese. En el futuro, deberían llevarse a cabo estudios que

profundicen en la relación entre el ensamblaje de SGs, una posible respuesta antiviral y la progresión de la infección de FMDV.

En células infectadas por FMDV la proteína G3BP1 se fragmenta en dos partes, la parte amino-terminal que contiene los dominios NTF2, el dominio ácido y PxxP; la parte carboxilo-terminal contiene el dominio RBD. Nuestros resultados mostraron que ambos fragmentos de G3BP1 inhibieron la traducción moderadamente *in vivo* (Figuras 25 y 26). El fragmento amino-terminal posee la propiedad de autoagregación (Tourrière et al, 2003), y de interacción con otras proteínas (Irvine et al, 2004). Esta capacidad puede favorecer la acumulación de RNP que provocan una inhibición parcial de la traducción. Por otro lado, el fragmento carboxilo-terminal, tiene la capacidad de unirse al RNA del IRES y a su vez, de interactuar con otras proteínas (Figura 27), lo que puede facilitar el reclutamiento del RNA a RNPs.

En conclusión, G3BP1 es una proteína que permite flexibilidad de secuencia para reconocer distintos RNAs, lo que en potencia permitiría que esta proteína tenga posibilidad de interactuar con RNAs de distinta naturaleza. G3BP1 es un inhibidor parcial de la traducción, y además, tiene la capacidad de interactuar directamente con proteínas como PTB y eIF4B implicadas en el proceso de inicio de la traducción. Estudios futuros permitirán dilucidar si G3BP1 modifica la estructura terciaria del RNA, o si interfiere en el ensamblaje del complejo 48S.

CONCLUSIONES

1) G3BP1 es una proteína de unión a RNA, localizada en gránulos de estrés. La región N-terminal contiene el dominio de unión a otras proteínas y el dominio C-terminal contiene el dominio de unión a RNA, RRM y RGG.

G3BP1 se une directamente al IRES de FMDV a través del dominio 1-2, la zona apical del dominio 3 y el dominio 5. La zona preferente de unión al IRES es la región de cadena sencilla del d5, que incluye el tramo de pirimidinas. Sin embargo, la sustitución de pirimidinas por purinas provoca un aumento de la interacción, sugiriendo que el determinante principal es la presencia de nucleótidos desapareados.

2) G3BP1 se une directamente al IRES de HCV, a través del dominio III.

3) La interacción de G3BP1 con el IRES de FMDV y HCV se compete por RNA citoplásmico, sugiriendo que la proteína reconoce RNAs celulares con afinidad diferente.

4) G3BP1 interactúa directamente con las proteínas PTB y eIF4B a través del extremo C-terminal de G3BP1 en ensayos de co-purificación con GST.

5) G3BP1 desplaza la unión de PTB al IRES de FMDV en ensayos de entrecruzamiento con luz UV.

6) G3BP1 es hidrolizada por la proteasa 3C de FMDV, dando lugar a dos fragmentos. El fragmento N-terminal (55 kDa) y el C-terminal (17 kDa).

7) G3BP1 es un inhibidor parcial de la traducción, *in vitro* e *in vivo*. Tanto el fragmento N-terminal como el C-terminal de G3BP1 son inhibidores parciales de la traducción cap- e IRES-dependiente.

8) Con los resultados de este trabajo proponemos que G3BP1 interactúa con proteínas que estimulan el inicio de la traducción, secuestrándolas temporalmente o reduciendo su capacidad de unión al IRES de FMDV, causando una inhibición parcial de la traducción.

BIBLIOGRAFÍA

Acker MG, Shin BS, Nanda JS, Saini AK, Dever TE, Lorsch JR (2009) Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *Journal of molecular biology* **385**: 491-506

Aitken CE, Lorsch JR (2012) A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 568-576

Algire MA, Maag D, Lorsch JR (2005) Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Molecular cell* **20**: 251-262

Anderson P, Kedersha N (2006) RNA granules. *The Journal of cell biology* **172**: 803-808

Andreev DE, Dmitriev SE, Terenin IM, Prassolov VS, Merrick WC, Shatsky IN (2009) Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic acids research* **37**: 6135-6147

Andreev DE, Fernandez-Miragall O, Ramajo J, Dmitriev SE, Terenin IM, Martinez-Salas E, Shatsky IN (2007) Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA* **13**: 1366-1374

Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N (2011) Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *Journal of virology* **85**: 6882-6892

Asano K, Clayton J, Shalev A, Hinnebusch AG (2000) A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes & development* **14**: 2534-2546

Atlas R, Behar L, Elliott E, Ginzburg I (2004) The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *Journal of neurochemistry* **89**: 613-626

Baguet A, Degot S, Cougot N, Bertrand E, Chenard MP, Wendling C, Kessler P, Le Hir H, Rio MC, Tomasetto C (2007) The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly. *Journal of cell science* **120**: 2774-2784

Belsham GJ, McInerney GM, Ross-Smith N (2000) Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *Journal of virology* **74**: 272-280

Berry KE, Peng B, Koditek D, Beeman D, Pagratis N, Perry JK, Parrish J, Zhong W, Doudna JA, Shih IH (2011a) Optimized high-throughput screen for hepatitis C virus translation inhibitors. *Journal of biomolecular screening* **16**: 211-220

Berry KE, Waghray S, Mortimer SA, Bai Y, Doudna JA (2011b) Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning. *Structure* **19**: 1456-1466

Bidet K, Dadlani D, Garcia-Blanco MA (2014) G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS pathogens* **10**: e1004242

Booker GW, Gout I, Downing AK, Driscoll PC, Boyd J, Waterfield MD, Campbell ID (1993) Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **73**: 813-822

Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621

Cobos Jimenez V, Martinez FO, Booiman T, van Dort KA, van de Klundert MA, Gordon S, Geijtenbeek TB, Kootstra NA (2015) G3BP1 restricts HIV-1 replication in macrophages and T-cells by sequestering viral RNA. *Virology* **486**: 94-104

Cohen BD, Bariteau JT, Magenis LM, Dias JA (2003a) Regulation of follitropin receptor cell surface residency by the ubiquitin-proteasome pathway. *Endocrinology* **144**: 4393-4402

Cohen M, Stutz F, Belgareh N, Haguenaer-Tsapis R, Dargemont C (2003b) Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* **5**: 661-667

Chiu WL, Wagner S, Herrmannova A, Burela L, Zhang F, Saini AK, Valasek L, Hinnebusch AG (2010) The C-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) promotes mRNA recruitment, scanning, and, together with eIF3j and the eIF3b RNA recognition motif, selection of AUG start codons. *Molecular and cellular biology* **30**: 4415-4434

Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, Kaufman R, Anderson P, Liu JO (2006) Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *The Journal of biological chemistry* **281**: 32870-32878

de Breyne S, Yu Y, Unbehauen A, Pestova TV, Hellen CU (2009) Direct functional interaction of initiation factor eIF4G with type 1 internal ribosomal entry sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9197-9202

Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**: 545-556

Dmitriev SE, Terenin IM, Dunaevsky YE, Merrick WC, Shatsky IN (2003) Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions. *Molecular and cellular biology* **23**: 8925-8933

Dorner AJ, Semler BL, Jackson RJ, Hanecak R, Duprey E, Wimmer E (1984) In vitro translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate. *J Virology* **50**: 507-514

Duchesne M, Schweighoffer F, Parker F, Clerc F, Frobert Y, Thang MN, Tocque B (1993) Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling. *Science* **259**: 525-528

Fernandez-Miragall O, Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E (2009) Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus research* **139**: 172-182

Fernández-Miragall O, Martínez-Salas E (2003) Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* **9**: 1333-1344

Fernandez-Miragall O, Ramos R, Ramajo J, Martinez-Salas E (2006) Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation. *RNA* **12**: 223-234

Fernandez N, Buddrus L, Pineiro D, Martinez-Salas E (2013) Evolutionary conserved motifs constrain the RNA structure organization of picornavirus IRES. *FEBS letters* **587**: 1353-1358

Fernandez N, Garcia-Sacristan A, Ramajo J, Briones C, Martinez-Salas E (2011) Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES. *Virology* **409**: 251-261

Filbin ME, Vollmar BS, Shi D, Gonen T, Kieft JS (2013) HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation. *Nature structural & molecular biology* **20**: 150-158

Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Lozano G, Diaz-Toledano R, Martinez-Salas E (2015) RNA-protein interaction methods to study viral IRES elements. *Methods* **91**: 3-12

French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD (2002) The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J* **34**: 223-231

Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B (1986) Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 8122-8126

Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony JP, Tocque B, Tazi J (1998) A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Molecular and cellular biology* **18**: 3956-3965

Garaigorta U, Heim MH, Boyd B, Wieland S, Chisari FV (2012) Hepatitis C virus (HCV) induces formation of stress granules whose proteins regulate HCV RNA replication and virus assembly and egress. *Journal of virology* **86**: 11043-11056

Gebhard JR, Ehrenfeld E (1992) Specific interactions of HeLa cell proteins with proposed translation domains of the poliovirus 5' noncoding region. *Journal of virology* **66**: 3101-3109

Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* **15**: 5383-5398

Gingras AC, Svitkin Y, Belsham GJ, Pause A, Sonenberg N (1996) Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5578-5583

Goyer C, Altmann M, Lee HS, Blanc A, Deshmukh M, Woolford JJ, Trachsel H, Sonenberg N (1993) TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol Cell* **25**: 10989-11004

Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N (1998) Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 11089-11094

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000a) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* **6**: 1099-1108

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000b) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular cell* **5**: 897-904

Hashem Y, des Georges A, Dhote V, Langlois R, Liao HY, Grassucci RA, Pestova TV, Hellen CU, Frank J (2013) Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature* **503**: 539-543

Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in biochemical sciences* **31**: 553-562

Hinnebusch AG (2011) Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **75**: 434-467

Hinnebusch AG (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual review of biochemistry* **83**: 779-812

Imataka H, Gradi A, Sonenberg N (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* **17**: 7480-7489

Imataka H, Sonenberg N (1997) Human eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell* **17**: 6940-6947

Irvine K, Stirling R, Hume D, Kennedy D (2004) Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *The International journal of developmental biology* **48**: 1065-1077

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 113-127

Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology* **62**: 2636-2643

Jang SK, Wimmer E (1990) Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes & development* **4**: 1560-1572

Jivotovskaya AV, Valásek L, Hinnebusch AG, Nielsen KH (2006) Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. *Mol Cell Biol* **26**: 1355-1372

Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virology* **73**: 718-724

Kafasla P, Lin H, Curry S, Jackson RJ (2011) Activation of picornaviral IRESs by PTB shows differential dependence on each PTB RNA-binding domain. *RNA* **17**: 1120-1131

Kafasla P, Morgner N, Poyry TA, Curry S, Robinson CV, Jackson RJ (2009) Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Molecular cell* **34**: 556-568

Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**: 104–113

Kapp LD, Lorsch JR (2004) GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *Journal of molecular biology* **335**: 923-936

Kaye NM, Emmett KJ, Merrick WC, Jankowsky E (2009) Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J Biol Chem* **284**: 17742-17750

Kedersha N, Anderson P (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods in enzymology* **431**: 61-81

Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* **151**: 1257-1268

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **179**: 871–884

Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**: 1431-1442

Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocque B, Mattick J (2001) Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *Journal of cellular biochemistry* **84**: 173-187

Kieft JS, Zhou K, Grech A, Jubin R, Doudna JA (2002) Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature structural biology* **9**: 370-374

Kim YK, Jang SK (1999) La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *The Journal of general virology* **80 (Pt 12)**: 3159-3166

Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: 273-284

Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *The Journal of biological chemistry* **273**: 18599-18604

Kolupaeva VG, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CU, Pestova TV (2005) Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* **11**: 470-486

Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* **15**: 8125-8148

Kozak M (1989) The scanning model for translation: an update. *The Journal of cell biology* **108**: 229-241

Lafuente E, Ramos R, Martinez-Salas E (2002) Long-range RNA-RNA interactions between distant regions of the hepatitis C virus internal ribosome entry site element. *The Journal of general virology* **83**: 1113-1121

Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* **270**: 21975-21983

Leblanc V, Delumeau I, Tocqué B (1999) Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells. *Oncogene* **18**: 4484-4493

Leblanc V, Tocque B, Delumeau I (1998) Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol Cell Biol* **18**: 5567-5578

Li W, Li Y, Kedersha N, Anderson P, Emara M, Swiderek KM, Moreno GT, Brinton MA (2002) Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *Journal of virology* **76**: 11989-12000

Liu F, Putnam A, Jankowsky E (2008) ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20209-20214

Lopez de Quinto S, Lafuente E, Martinez-Salas E (2001) IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* **7**: 1213-1226

Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E (1999) Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology* **255**: 324-336

Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E (2000) Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* **6**: 1380-1392

Lopez de Quinto S, Saiz M, de la Morena D, Sobrino F, Martinez-Salas E (2002) IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic acids research* **30**: 4398-4405

Lorsch JR, Herschlag D (1998) The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide. *Biochemistry* **37**: 2180-2193

Loughran G, Sachs MS, Atkins JF, Ivanov IP (2012) Stringency of start codon selection modulates autoregulation of translation initiation factor eIF5. *Nucleic Acids Res* **40**: 2898-2906

Lozano G, Martinez-Salas E (2015) Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr Opin Virol* **12**: 113-120

Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD (2000) Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nature structural biology* **7**: 1105-1110

Lukong KE, Chang K, Khandjian EW, Richard S (2008) RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends in genetic* **24**: 416-425

Lunde BM, Moore C, Varani G (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 479-490

Luz N, Beck E (1991) Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **65**: 6486-6494

Maag D, Fekete C, Gryczynski Z, Lorsch J (2005) A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol Cell* **17**: 265-275

Marcotrigiano J, Gingras AC, N. S, Burley SK (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* **3**: 707-716

Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G (2009) Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* **136**: 447-460

Marintchev A, Kolupaeva V, Pestova T, Wagner G (2003) Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci* **100** 1535–1540

Martin-Marcos P, Cheung YN, Hinnebusch AG (2011) Functional elements in initiation factors 1, 1A, and 2beta discriminate against poor AUG context and non-AUG start codons. *Molecular and cellular biology* **31**: 4814-4831

Martinez-Salas E (2008) The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends in microbiology* **16**: 230-237

Martinez-Salas E, Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Lozano G, Diaz-Toledano R (2015) Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus research* **206**: 62-73

Martinez-Salas E, Saiz JC, Davila M, Belsham GJ, Domingo E (1993) A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *Journal of virology* **67**: 3748-3755

Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW (2002) Trapping of messenger RNA by fragile X mental retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Human Mol Genetics* **11**: 3007-3017

Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, Tanaka J, Gallouzi I, Pelletier J (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation

independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Cell Biol* **17**: 4212-4219

McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ (2005) Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem* **280**: 16925-16933

Mitchell SF, Walker SE, Algire MA, Park EH, Hinnebusch AG, J.R. L (2010) The 5'-7-methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway. *Mol Cell* **39**: 950-962

Monie TP, Perrin AJ, Birtley JR, Sweeney TR, Karakasiliotis I, Chaudhry Y, Roberts LO, Matthews S, Goodfellow IG, Curry S (2007) Structural insights into the transcriptional and translational roles of Ebp1. *EMBO J* **26**: 3936-3944

Montero H, Rojas M, Arias CF, S. L (2008) Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J Virology* **82**: 1496-1504

Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**: 1514-1518

Nichols R, Wang X, Tang J, Hamilton J, High F, Herschman H, Rigby W (2000) The RGG domain in hnRNPA2 affects subcellular localisation. *Exp Cell Res* **256**: 522-532

Niepmann M, Petersen A, Meyer K, Beck E (1997) Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **71**: 8330-8339

Oberer M, Marintchev A, Wagner G (2005) Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *Genes Dev* **19**: 2212-2223

Ohlmann T, Rau M, Pain VM, Morley SJ (1996) The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J* **15**: 1371-1382

Ortega AD, Willers IM, Sala S, Cuezva JM (2010) Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Journal of cell science* **123**: 2685-2696

Pacheco A, Lopez de Quinto S, Ramajo J, Fernandez N, Martinez-Salas E (2009) A novel role for Gemin5 in mRNA translation. *Nucleic acids research* **37**: 582-590

Pacheco A, Martinez-Salas E (2010) Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**: 458927

Pacheco A, Reigadas S, Martinez-Salas E (2008) Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* **8**: 4782-4790

Panas MD, Varjak M, Lulla A, Eng KE, Merits A, Karlsson Hedestam GB, McInerney GM (2012) Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Molecular biology of the cell* **23**: 4701-4712

Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B (1996) A Ras-GTPase-activating protein sh3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol* **16**: 2561-2569

Pazman C, Mayes CA, Fanto M, Haynes SR, Mlodzik M (2000) Rasputin, the Drosophila homologue of the RasGAP SH3 binding protein, functions in ras- and Rho-mediated signaling. *Development* **127**: 1715-1725

Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**: 320-325

Perard J, Leyrat C, Baudin F, Drouet E, Jamin M (2013) Structure of the full-length HCV IRES in solution. *Nature communications* **4**: 1612

Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**: 67-83

Pilipenko EV, Pestova TV, Kolupaeva VG, Khitrina EV, Poperechnaya AN, Agol VI, Hellen CUT (2000) A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev* **14**: 2028-2045

Pilipenko EV, Victokorova EG, Guest ST, Agol VI, Roos P (2001) Cell specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *EMBO J* **20**: 6899-6908

Piñeiro D, Fernández N, Ramajo J, Martínez-Salas E (2013) Gemin5 promotes IRES interaction and translation control through its C-terminal region. *Nucleic Acids Res* **41**: 1017-1028

Piñeiro D, Ramajo J, Bradrick SS, Martínez-Salas E (2012) Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets. *Nucleic Acids Res* **40**: 4942-4953

Pisarev AV, Chard LS, Kaku Y, Johns HL, Shatsky IN, Belsham GJ (2004) Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virology* **78**: 4487-4497

Pisarev AV, Kolupaeva VG, Pisareva VP, Merrick WC, Hellen CU, Pestova TV (2006) Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes Dev* **20**: 624-636

Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CUT, Pestova TV (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Molecular cell* **37**: 196-210

Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CUT, Pestova TV (2008) Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* **135**: 1237-1250

Pöyry TAA, Kaminski A, Connell EJ, Fraser CS, Jackson RJ (2007) The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes Dev* **21**: 3149-3162

Prigent M, Barlat I, Langen H, Dargemont C (2000) IkappaBalpha and IkappaBalpha /NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *J Biol Chem* **275**: 36441-36449

Rajyaguru P, Parker R (2012) RGG motif proteins: modulators of mRNA functional states. *Cell Cycle* **11**: 2594-2599

Ramos R, Martínez-Salas E (1999) Long-range Rna interactions between structural domains of the ahtovirus internal ribosome entry site (IRES). *RNA* **5**: 1374-1383

Ray D, Kazan H, Cook KB, Weirauch MT, Najafabadi HS, Li X, Gueroussov S, Albu M, Zheng H, Yang A, Na H, Irimia M, Matzat LH, Dale RK, Smith SA, Yarosh CA, Kelly SM, Nabet B, Mecnas D, Li W, Laishram RS, Qiao M, Lipshitz HD, Piano F, Corbett AH, Carstens RP, Frey BJ, Anderson RA, Lynch KW, Penalva LO, Lei EP, Fraser AG, Blencowe BJ, Morris QD, Hughes TR (2013) A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* **499**: 172-177

Reineke LC, Dougherty JD, Pierre P, Lloyd RE (2012) Large G3BP-induced granules trigger eIF2alpha phosphorylation. *Molecular biology of the cell* **23**: 3499-3510

Reineke LC, Lloyd RE (2013) Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection. *Virology* **436**: 255-267

Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, D. G (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* **17**: 6587-6598

Rijnbrand R, Thiviyanathan V, Kaluarachchi K, Lemon SM, Gorenstein DG (2004) Mutational and structural analysis of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus and GB virus B internal ribosome entry sites. *J Mol Biol* **343**: 805-817

Rodriguez-Pulido M, Serrano P, Saiz M, Martinez-Salas E (2007) Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a, b, and PABP RNA binding proteins. *Virology* **364**: 466-474

Rubtsova MP, Sizova DV, Dmitriev SE, Ivanov DS, Prassolov VS, Shatsky IN (2003) Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J Biol Chem* **278**: 22350-22356

Shin BS, Maag D, Roll-Mecak A, Arefin MS, Burley SK, Lorsch JR, Dever TE (2002) Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* **111**: 1015-1025

Singh CR, He H, Li M, Yamamoto Y, Asano K (2004) Efficient incorporation of eukaryotic initiation factor 1 into the multifactor complex is critical for formation of functional ribosomal preinitiation complexes. *J Biol Chem* **279**: 31910-31920

Siridechadilok B, Fraser CS, Hall RJ, Doudna JA, Nogales E (2005) Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* **310**: 1513-1515

Soncini C, Berdo I, Draetta G (2001) Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene* **20**: 3869-3879

Song Y, Tzima E, Ochs K, Bassili G, Trusheim H, Linder M, Preissner KT, Niepmann M (2005) Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* **11**: 1809-1824

Spirin AS (2009) How does a scanning ribosomal particle move along the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA? Brownian Ratchet model. *Biochemistry* **48**: 10688-10692

Spriggs KA, Bushell M, Willis AE (2010) Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* **40**: 228-237

Srivastava SP, Kumar KU, Kaufman RJ (1998) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**: 2416–2423

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189** 113-130

Svitkin YV, Evdokimova VM, Brasey A, Pestova TV, Fantus D, Yanagiya A, Imataka H, Skabkin MA, Ovchinnikov LP, Merrick WC, Sonenberg N (2009) General RNA-binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation. *EMBO J* **28**: 58-68

Sweeney TR, Abaeva IS, Pestova TV, Hellen CU (2014) The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J* **33**: 76-92

Szamecz B, Rutkai E, Cuchalová L, Munzarová V, Herrmannová A, Nielsen KH, Burela L, Hinnebusch AG, L. V (2008) eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA. *Genes Dev* **22**: 2414–2425

Terenin IM, Dmitriev SE, Andreev DE, I.N. S (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nature Struct Biol* **15**: 836-841

Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell signaling* **9**: 153-158

Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* **160**: 823-831

Tourrière H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J (2001) RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* **21**: 7747-7760

Valasek L, Mathew AA, Shin BS, Nielsen KH, Szamecz B, Hinnebusch AG (2003) The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes & development* **17**: 786-799

Valasek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG (2002) Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *EMBO J* **21**: 5886-5898

Vitali F, Henning A, Oberstrass FC, Hargous Y, Auweter SD, Erat M, Allain FH (2006) Structure of the two most C-terminal RNA recognition motifs of PTB using segmental isotope labeling. *EMBO J* **25**: 150-162

Walsh D, Mohr I (2011) Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* **9**: 860-875

Wek SA, Zhu S, Wek RC (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is

required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell* **15**: 4497-4506

White JP, Cardenas AM, Marissen WE, Lloyd RE (2007) Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell* **15**: 295-305

White JP, Lloyd RE (2011) Poliovirus unlinks TIA1 aggregation and mRNA stress granule formation. *J Virology* **85**: 12442-12454

White JP, Lloyd RE (2012) Regulation of stress granules in virus systems. *Trends in microbiology* **20**: 175-183

Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in biochemical sciences* **28**: 182-188

Winslow S, Leandersson K, Larsson C (2013) Regulation of PMP22 mRNA by G3BP1 affects cell proliferation in breast cancer cells. *Mol Cancer* **12**: 156

Yamasaki S, Anderson P (2008) Reprogramming mRNA translation during stress. *Current opinion in cell biology* **20**: 222-226

Yang F, Peng Y, Murray EL, Otsuka Y, Kedersha N, Schoenberg DR (2006) Polysome-bound endonuclease PMR1 is targeted to stress granules via stress-specific binding to TIA-1. *Mol Cell Biol* **26**: 8803-8813

Yi Z, Fang C, Pan T, Wang J, Yang P, Yuan Z (2006) Subproteomic study of hepatitis C virus replicon reveals Ras-GTPase-activating protein binding protein 1 as potential HCV RC component. *Biochem Biophys Res Commun* **350**: 174-178

Yi Z, Pan T, Wu X, Song W, Wang S, Xu Y, Rice CM, Macdonald MR, Yuan Z (2011) Hepatitis C virus co-opts Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1 for its genome replication. *J Virology* **85**: 6996-7004

Yu C, York B, Wang S, Feng Q, Xu J, O'Malley BW (2007) An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell* **25**: 765-778

Yu Y, Abaeva IS, Marintchev A, Pestova TV, Hellen CU (2011) Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors. *Nucleic acids research* **39**: 4851-4865

Zhang H, Zhang S, He H, Zhao W, Chen J, Shao RG (2012) GAP161 targets and downregulates G3BP to suppress cell growth and potentiate cisplatin-mediated cytotoxicity to colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Sci* **103**: 1848-1856