



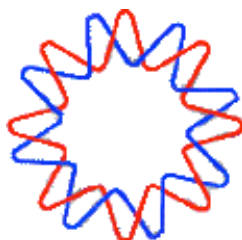
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Regulación de la síntesis de
proteína celular y viral durante una
infección por rotavirus

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
HILDA MONTERO L. DE GUEVARA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN



CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT y por DGEP.

Índice

	Página
Resumen	i, ii
Introducción	1
Antecedentes	2
La traducción celular eucarionte	3
Iniciación	3
Traducción cap-independiente	5
Regulación traduccional a nivel de iniciación	6
eIF4G y eIF4E como blancos de control traduccional	7
Fosforilación de eIF2 α como mecanismo de control traduccional	9
PKR y su respuesta a la infección viral	11
Respuesta de interferón vía PKR	12
Defosforilación de eIF2 α	12
Gránulos de estrés	13
Regulación del inicio de la traducción por virus	15
Regulación de la síntesis de proteína por alteración del complejo de inicio eIF4F	16
Regulación de la fosforilación de eIF2 durante infecciones virales	19
Virus de la parálisis del grillo	21
Alfavirus	22
Reovirus	23
Hepatitis C	23

	Página
Rotavirus	
Generalidades	24
Genoma viral	25
Características de la partícula viral	27
Función de las proteínas virales	28
Ciclo replicativo	32
Mecanismo propuesto para la regulación de la síntesis de proteína durante la infección por rotavirus	33
Hipótesis	35
Objetivos	35
Materiales y métodos	37
Resultados	42
Estudio del papel del factor de iniciación eIF4GI y de la proteína viral NSP3 en la síntesis de proteína viral y celular durante la infección con rotavirus	42
La traducción de mRNAs de rotavirus es resistente a la fosforilación de eIF2 α	46
eIF2 α es fosforilado durante el ciclo replicativo de rotavirus	48
Las proteínas virales VP2, NSP2 y NSP5 están involucradas en la fosforilación de eIF2 α durante la infección	55
La infección con rotavirus provoca la redistribución de algunas proteínas de gránulos de estrés y evita la formación de gránulos de estrés	63
VP3 es una proteína viral que participa en la inhibición de gránulos de estrés	66
PABP se transloca al núcleo después de las 5 h p.i.	80

	Página
PABP y su relación con la síntesis de proteína celular durante la infección con rotavirus	82
Relación de TIA-1 con la inhibición de la síntesis de proteína celular durante la infección con rotavirus	86
La salida de TIA-1 durante la infección con rotavirus, no sólo se da en respuesta a la fosforilación de eIF2 α	89
Discusión y perspectivas	91
Conclusiones	102
Bibliografía	103
Apéndice I	112

Resumen

La mayoría de los RNAs mensajeros eucariontes (mRNAs) son traducidos por medio del mecanismo de scanning, que involucra el reconocimiento del extremo 5' del mRNA y su estructura cap por el complejo eIF4F, el cual está formado de los factores eucariontes de iniciación (eIFs): eIF4E, eIF4G y eIF4A. Después, la subunidad ribosomal 40S y el complejo ternario (eIF2-GTP-Met-tRNA_i) son reclutados en el extremo 5' y comienza a recorrer al mRNA hasta encontrar al primer codón de iniciación AUG.

En respuesta al estrés, las células eucariontes inhiben la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de eIF2 α en la serina 51, un componente esencial del complejo heterotrimérico eIF2 que lleva al tRNA (Met-tRNA) junto a la subunidad ribosomal 40S. En general, la respuesta de estrés trae consigo a la inhibición global de la traducción, sin embargo, esta inhibición no es absoluta pues hay una traducción selectiva de mRNAs que es requerida para la supervivencia celular bajo el estrés. Cuando eIF2 α se encuentra fosforilado, se forman estructuras citoplásmicas conocidas como gránulos de estrés, éstos son disueltas cuando las condiciones de estrés son removidas.

Rotavirus causa gastroenteritis en niños y animales. Durante la infección con rotavirus, la síntesis de proteína celular es abatida. Ha sido propuesto que la proteína viral no estructural NSP3 es la responsable de este fenotipo por unirse al eIF4GI y evitar su unión con la proteína de unión al poli-A (PABP), haciendo eficiente la traducción de los mRNAs de rotavirus. En este trabajo, silenciamos la expresión de NSP3 y eIF4GI en células infectadas usando la técnica de RNA de interferencia y encontramos que ni NSP3 ni eIF4GI son necesarias para la traducción de los mRNAs de rotavirus. Interesantemente, cuando la expresión de NSP3 fue silenciada, la progenie viral aumentó y esto correlacionó con un incremento de la síntesis de RNA de doble cadena (genoma viral).

Como respuesta a la infección viral, en muchos tipos celulares se induce la fosforilación de eIF2 α ; investigamos si durante la infección con rotavirus eIF2 α es fosforilado. Inesperadamente, encontramos que eIF2 α está fosforilado en células infectadas y éste estado de fosforilación es mantenido a través del ciclo replicativo, sin embargo, los mRNAs de rotavirus son traducidos eficientemente en células estresadas e infectadas donde eIF2 α se encuentra fosforilado. También encontramos que las proteínas virales VP2, NSP2 y NSP5 están involucradas en el estado de fosforilación de eIF2 α en células infectadas. La caracterización de la síntesis de proteínas en células que expresan una mutante de eIF2 α , la cual no es fosforilable (S51A), sugiere que la fosforilación de eIF2 α reduce la traducción de los mRNAs de rotavirus, así como de la progenie viral. Por otra parte, examinamos la formación de gránulos de estrés como respuesta a la fosforilación de eIF2 α en células infectadas y encontramos que estas estructuras no son formadas durante la infección con rotavirus. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la proteína viral VP3, podría ser la responsable de prevenir la formación de los gránulos de estrés.

Summary

Most of eukaryotic messenger RNAs (mRNAs) are translated via the scanning mechanism, which involves the recognition of the 5'-end of the mRNA and its cap structure by the complex eIF4F, which is composed of eukaryotic initiation factors (eIFs): eIF4E, eIF4G and eIF4A. After recruitment, the 40s ribosomal subunit and the ternary complex (eIF2-GTP-Met-tRNAⁱ) interact with the 5'-end of the mRNA, and scan the mRNA until the first AUG initiation codón is found.

In response to stress, eukaryotic cells shut down protein synthesis through the phosphorylation of eIF2 α at serine 51, an essential component of the heterotrimeric eIF2 complex that loads the initiator tRNA (Met-tRNA) onto the 40s ribosomal subunit. In general, stress induces the attenuation of global translation, however, it is often accompanied by a switch to the selective translation that are required for cell survival under stress. When eIF2 α becomes phosphorylated, cytoplasmic structures known as stress granules are formed, these are dissolved when the stress conditions are removed.

Rotavirus cause severe gastroenteritis in children and young animals. During rotavirus infection the cellular protein synthesis is shut down. It was proposed that the viral non-structural protein NSP3 was responsible for this phenotype since it binds eIF4GI and evicts the poly A Binding Protein (PABP) from its binding site on eIF4GI, leading to the enhancement of translation of rotaviral mRNAs. In this work, we silenced the expression of NSP3 and eIF4GI in infected cells using RNA interference, and we found that neither NSP3 nor eIF4GI are necessary for the translation of rotavirus mRNAs. Interestingly, when the expression of NSP3 was silenced, the yield of viral progeny increased and this observation correlated with an increased synthesis of dsRNA (viral genome).

As a cellular response to viral infection many cell types induce phosphorylation of eIF2 α , we investigated if during rotavirus infection eIF2 α became phosphorylated. Unexpectedly, we found that eIF2 α is phosphorylated in infected cells and this phosphorylation state is maintained throughout the replicative cycle, nevertheless the mRNAs of rotavirus are efficiently translated in stressed, and infected cells, where eIF2 α is highly phosphorylated. We also found that the viral proteins VP2, NSP2 and NSP5 were involved in the eIF2 α phosphorylation status in infected cells. The characterization of viral and cellular protein synthesis in cells which express a mutant form of eIF2 α that is non-phosphorylatable (S51A), suggest that the phosphorylation of eIF2 α reduces the translation of rotavirus mRNAs and the yield viral progeny. We also examined the formation of stress granules as a result of eIF2 α phosphorylation in infected cells, we found that these structures were not formed during the infection with rotavirus. Finally, our results suggest that the viral protein VP3 might be the viral protein responsible for preventing the formation of stress granules.

Regulación de la síntesis de proteína celular y viral durante una infección por rotavirus

Introducción

El estudio de la regulación génica se enfocaba, hasta hace poco tiempo, a la regulación a nivel transcripcional, hoy en día, se ha visto que el proceso de la traducción también es un blanco de regulación de la expresión génica, que responde a una gran variedad de condiciones. Las modificaciones en uno o más pasos del control de la biosíntesis de proteínas ha sido asociado con alteraciones en la regulación del crecimiento y ciclo celular ³. Consistente con esto, recientemente se ha observado que el control traduccional y/o los componentes de la maquinaria de traducción se ven alterados en algunas patologías como el cáncer ⁴ e infecciones virales ^{5,6}, e inclusive, más recientemente se ha encontrado que existe toda una maquinaria celular de regulación a través de micro RNAs que inhiben o alteran de modo específico la traducción de ciertos mRNAs; es por esto que se ha despertado un gran interés por entender finamente el mecanismo de síntesis de proteínas celulares y de su control.

El proceso de la traducción es muy complejo y es aún poco conocido. En las últimas dos décadas se han aportado grandes avances en el entendimiento del mecanismo de la traducción, así como de su regulación. Hasta la fecha se sabe que la regulación transcripcional puede ser importante en la expresión de un gene, sin embargo, se ha determinado que un aumento en la transcripción de un gene, no necesariamente trae

conigo un aumento en su traducción. Este hecho ha despertado gran interés en determinar los mecanismos que llevan a la selección de los transcritos que se traducen mas eficientemente, pero aún, hasta ahora no existe una respuesta general a esta interrogante. El estudio de la síntesis de proteínas a partir de RNA mensajeros (mRNAs) virales, ha aportado grandes avances en el entendimiento de la traducción celular, y ha servido como una herramienta para entender y conocer como se regula la síntesis de proteínas, así como las proteínas celulares que están involucradas en el proceso.

En este trabajo, nos hemos enfocado al estudio de la regulación traduccional durante la infección con rotavirus. Hemos abordado el estudio de la función tanto de proteínas virales como celulares, en la regulación síntesis de proteínas celulares y virales lo que nos permitió aportar datos interesantes con respecto a la regulación traduccional de la célula.

Antecedentes

Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que necesitan la maquinaria de su célula huésped para la replicación de su genoma, el ensamble de nuevas partículas y la liberación de la nueva progenie viral. Mientras un buen número de virus codifican para la maquinaria enzimática requerida para la replicación y transcripción de su genoma, ningún virus codifica para componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas. Esta condición hace que los virus sean totalmente dependientes de la maquinaria celular para la traducción de sus mRNAs.

Interesantemente, los virus han evolucionado estrategias sofisticadas que favorecen la traducción de sus transcritos sobre los mRNAs celulares. Antes de abordar los

conigo un aumento en su traducción. Este hecho ha despertado gran interés en determinar los mecanismos que llevan a la selección de los transcritos que se traducen mas eficientemente, pero aún, hasta ahora no existe una respuesta general a esta interrogante. El estudio de la síntesis de proteínas a partir de RNA mensajeros (mRNAs) virales, ha aportado grandes avances en el entendimiento de la traducción celular, y ha servido como una herramienta para entender y conocer como se regula la síntesis de proteínas, así como las proteínas celulares que están involucradas en el proceso.

En este trabajo, nos hemos enfocado al estudio de la regulación traduccional durante la infección con rotavirus. Hemos abordado el estudio de la función tanto de proteínas virales como celulares, en la regulación síntesis de proteínas celulares y virales lo que nos permitió aportar datos interesantes con respecto a la regulación traduccional de la célula.

Antecedentes

Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que necesitan la maquinaria de su célula huésped para la replicación de su genoma, el ensamble de nuevas partículas y la liberación de la nueva progenie viral. Mientras un buen número de virus codifican para la maquinaria enzimática requerida para la replicación y transcripción de su genoma, ningún virus codifica para componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas. Esta condición hace que los virus sean totalmente dependientes de la maquinaria celular para la traducción de sus mRNAs.

Interesantemente, los virus han evolucionado estrategias sofisticadas que favorecen la traducción de sus transcritos sobre los mRNAs celulares. Antes de abordar los

mecanismos de traducción empleados por distintos virus, se describirá el mecanismo general de traducción celular y los componentes involucrados en este.

La traducción celular eucarionte

La síntesis de proteína celular es realizada por los ribosomas que actúan junto con un gran número de factores accesorios para traducir la información genética contenida en el mRNA. El proceso de la traducción, se divide usualmente en tres fases: iniciación, alargamiento y terminación. La fase de iniciación engloba todos los eventos necesarios para que se lleve a cabo el ensamble del ribosoma sobre el codón de inicio (AUG) del mRNA. La fase de alargamiento comprende la síntesis del polipéptido propiamente dicha y finalmente, la fase de terminación ocurre cuando se libera el péptido recién sintetizado y el ribosoma del mRNA ^{7, 102}.

Iniciación

La iniciación es la fase más regulada de la traducción; en ella participan proteínas celulares conocidas como factores de inicio de la traducción o eIFs (del inglés ekaryote Initiation Factor). Se estima que al menos son 25 eIFs los que participan en esta fase, sin incluir a las proteínas ribosomales y a las tRNAs sintetetasas ¹⁰⁷.

El mecanismo convencional de traducción de la mayoría de los mRNA celulares es un proceso que involucra a los extremos 3' y 5' del mRNA. En general, los mRNAs celulares se caracterizan por tener una estructura llamada cap (m^7GpppX) en el extremo 5' y un tracto poliadenilado (poli A) en el extremo 3'. El inicio de la traducción comienza con el reclutamiento del cap del mRNA por el complejo eIF4F; este complejo proteico esta

formado por 3 factores de inicio: la proteína de unión al cap (eIF4E), una helicasa (eIF4A) y el factor eIF4G que sirve como eslabón para la interacción de eIF4E y eIF4A (Fig. 1) ^{8,9}.

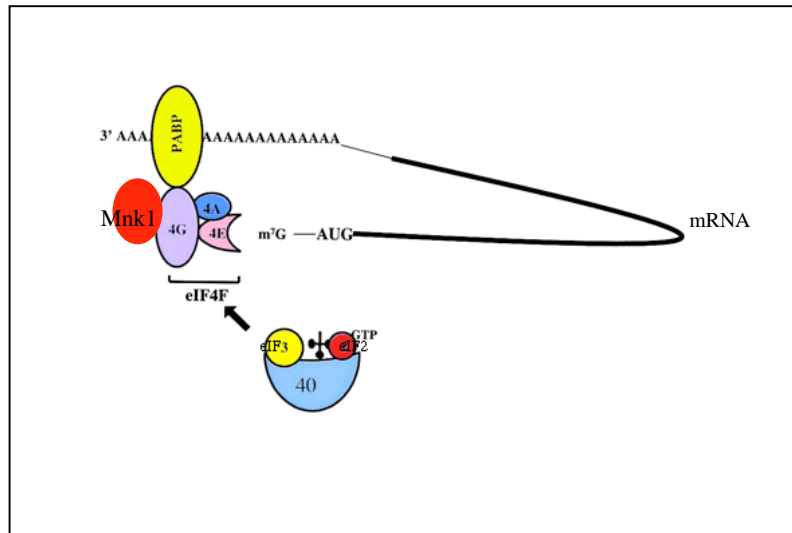


Figura 1. Factores de inicio de la traducción ¹.

eIF4G interactúa también con la proteína conocida como PABP (Poly-A Binding Protein) que se encuentra unida al extremo 3' poli-A del mRNA dando lugar a la pseudo-circularización del mRNA vía interacción 3'-poli-A del mRNA-PABP-eIF4G-eIF4E-cap del extremo 5' del mRNA (figura 1); se ha demostrado en estudios *in vitro*, que esta pseudo-circularización del mRNA hace más eficiente la traducción ^{8,10,11}.

Por otra parte, eIF4G interactúa también con el factor de inicio eIF3, el cual recluta a la subunidad ribosomal 40S y al complejo ternario eIF2-GTP-tRNA-met, dando como resultado el complejo de preiniciación conocido como 43S, que está listo para interactuar con el mRNA y recorrerlo (scan) hasta encontrar el primer codón de inicio (AUG) en donde se hidroliza el GTP del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA-met, favoreciendo la interacción

de la subunidad ribosomal 40S y la subunidad 60S, lo que da como resultado la formación del complejo 80S, para así dar inicio a la síntesis del péptido propiamente dicha (fase de alargamiento).

Después de esta interacción, una vez que el complejo ternario deposita el tRNA-met_i a su anticodón, eIF2 es liberado como complejo binario eIF2-GDP, finalmente, el GDP del complejo binario es reciclado a GTP por el factor eIF2B, para ser utilizado en una siguiente ronda de inicio de traducción ^{8,9, 102}.

Traducción cap-independiente

Es importante resaltar que también existe una forma de traducción no convencional o cap-independiente en donde un mRNA puede ser traducido vía un elemento denominado IRES (Internal Ribosome Entry Site). En este mecanismo, se propone que el mRNA es capaz de reclutar a la subunidad ribosomal 40S en un sitio interno del mRNA, y de modo independiente del complejo eIF4F, que puede o no requerir de proteínas celulares canónicas o no canónicas para favorecer la traducción. Estas proteínas accesorias son conocidas como ITAFs (IRES-Transacting factors) ^{12,13}.

Los IRES son estructuras secundarias complejas en el mRNA que presentan una longitud mayor a los 300 nucleótidos. Actualmente los IRES virales se agrupan en 5 tipos, esta clasificación se basa en la estructura primaria y secundaria del IRES, así como la distancia del IRES al AUG de inicio ¹⁰².

Los IRES fueron descubiertos en los mRNAs virales de picornavirus por lo que, inicialmente se pensó que la traducción cap-independiente era sólo empleada por transcritos virales. Actualmente se sabe que también existen mRNAs celulares que poseen estructuras

IRES y que pueden también emplear esta estrategia de traducción. Se cree que la presencia de IRES en un mRNA le confiere la particularidad de poderse traducir cuando el mecanismo de traducción cap-dependiente es limitante. En general, se puede decir que los mRNAs celulares con IRES son aquellos que necesitan ser traducidos cuando la célula necesita recuperarse de condiciones anormales en las que la traducción dependiente del complejo eIF4F está inhibida en respuesta a condiciones particulares como por ejemplo, el estrés celular, mitosis y diferenciación^{14,15}.

A pesar del conocimiento que se tiene actualmente acerca del funcionamiento de los IRES, es poco lo que se sabe de cómo funcionan realmente para poder reclutar a la subunidad ribosomal en el mRNA. Recientemente, se ha hipotetizado que la interacción entre el IRES y el rRNA 18S son importantes para que la subunidad ribosomal pequeña sea reclutada a un mRNA con IRES. Esta idea surge de las observaciones obtenidas en el estudio de la función de la UTR 5' del mRNA de la proteína Gtx, en donde se encuentra que una región de sólo 9 nucleótidos es complementaria al rRNA 18S y puede funcionar como IRES, de ahí que se le denomine mini-IRES por su tamaño^{16,17}.

Regulación traduccional a nivel de iniciación

Como mencionamos anteriormente, la fase de iniciación es la fase mas regulada en el proceso de traducción. En esta fase participan una gran variedad de proteínas celulares, las cuales cumplen funciones diversas y a pesar de que todas tienen importancia durante esta fase, se ha observado el principal punto de regulación involucra la formación del complejo eIF4F (a través de eIF4E y eIF4G) y al factor eIF2 los cuales son requeridos para

reclutar a la subunidad ribosomal 40S al mRNA durante el proceso de traducción cap-dependiente.

eIF4G y eIF4E como blancos de control traduccional

eIF4E que es la proteína de unión al cap, es el factor de inicio de la traducción menos abundante y esta característica lo hace un factor limitante en la formación del complejo eIF4F. Se han encontrado tres mecanismos por los cuales eIF4E no se encuentra disponible para formar el complejo eIF4F^{18,19}. Uno de los mecanismos es a través de las proteínas 4EBPs (eIF4E Binding Protein), estas proteínas son consideradas como represores traduccionales ya que se unen y secuestran al factor eIF4E, evitando que se una a eIF4G. Se han caracterizados 3 tipos de proteína 4EBPs (4EBP-1, -2 y -3); aunque se desconoce la importancia de la diversidad de estas proteínas. De los tres tipos de 4EBPs, 4EBP-1 es la mejor caracterizada y se sabe que es una fosfoproteína y que su unión a eIF4E depende de su estado de fosforilación^{20,21}. Cuando las proteínas 4EBP-1 se encuentran hiperfosforiladas por la cinasa FRAP/mTOR, no se pueden unir a eIF4E y este es funcional. Cuando estas proteínas están hipofosforiladas, se unen a eIF4E evitando su interacción con eIF4G y por lo tanto la traducción cap dependiente es inhibida ya que no se puede formar el complejo eIF4F^{5,19,22}.

Un segundo mecanismo de regulación sobre eIF4E es la fosforilación en la serina 209 por la cinasa MnK (MnK1 y MnK2). Esta cinasa es reclutada al complejo eIF4F para fosforilar a eIF4E a través de su interacción con eIF4G; se ha sugerido que esta estrategia asegura que eIF4E sea fosforilado sólo cuando forma parte del complejo eIF4F^{5,19,23-25}. En mamíferos, la estimulación de la traducción por factores de crecimiento, suero o nutrientes

correlaciona con el incremento de fosforilación de eIF4E y la defosforilación de eIF4E correlaciona con la inhibición de la traducción cap-dependiente en condiciones de choque térmico, falta de nutrientes o por la infección con algunos virus ^{19,26}.

Finalmente, un tercer mecanismo de regulación radica en la abundancia de eIF4E ¹⁹, de manera interesante se ha observado que la sobre-expresión de eIF4E causa la transformación maligna de fibroblastos y células epiteliales de humano, y promueve la formación de tumores en ratones transgénicos. Consistente con el potencial oncogénico de eIF4E, varios estudios han mostrado que tumores humanos expresan altos niveles de esta proteína y ha sido de gran interés el estudio de la regulación de este factor en la búsqueda del control de estas patologías. Se ha despertado un gran interés en el uso de rapamicina como agente terapéutico en el desarrollo de cáncer, dado que esta droga inhibe específicamente a la cinasa FRAP/mTOR provocando la hipofosforilación de las 4E-BPs, lo que da como resultado que eIF4E no sea reclutado al complejo eIF4F ^{3,4,22}.

eIF4G se ha descrito como una proteína clave en el inicio de la traducción cap-dependiente. Existen dos isoformas de este factor, eIF4GI y eIF4GII. Estas proteínas comparten 46% de identidad y se ha propuesto que son funcionalmente intercambiables *in vitro*, sin embargo, eIF4GII se encuentra en menor cantidad que eIF4GI y representa solo el 15% del total de las proteínas eIF4Gs en células HeLa ²⁷. Por otra parte, eIF4GI tiene 5 variantes (a, b, c, d y e) que resultan de usar codones alternativos de iniciación en fase, dando como resultado variantes en el tamaño del extremo amino terminal que va de los 1600 aminoácidos para la variante más grande (a) a 1404 aminoácidos para la variante más pequeña (e). Hasta el momento se desconoce cual es la función biológica de estas variantes

²⁸. eIF4GII es una fosfoproteína que se hiperfosforila durante la mitosis, donde la traducción cap-dependiente es inhibida, sin embargo, la regulación de su fosforilación y las cinasas responsables no son bien conocidas ²³. Sonenberg y colaboradores encontraron que durante la diferenciación celular eIF4GII es reclutado preferencialmente al complejo eIF4F y en base a estos datos han sugerido que el reclutamiento de este factor es para favorecer la traducción de un grupo específico de mRNAs cuya traducción es necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación celular ²⁹. Tanto eIF4GI como eIF4GII se encuentran presentes en las células y aún no es claro si son funcionalmente intercambiables *in vivo*, su proporción relativa en distintas líneas celulares y si es que tienen alguna “especialización” durante ciertas condiciones celulares.

Fosforilación de eIF2 α como mecanismo de control traduccional

El factor de inicio eIF2 es un punto clave en la regulación traduccional en respuesta a estrés. Este factor está formado por tres subunidades (α , β y γ) y es una fosfoproteína que es fosforilada en la serina 51 de la subunidad α . La fosforilación de eIF2 α es una señal que regula el inicio de la traducción dado que, cuando este factor se encuentra fosforilado, se une al factor eIF2B con alta afinidad inhibiéndose el reciclamiento de GDP por GTP en el complejo binario eIF2-GDP, y como consecuencia eIF2 no se puede unir al tRNA-met, no se forma el complejo ternario y por lo tanto no puede llevarse a cabo el inicio de la traducción. Es importante mencionar que la cantidad del factor eIF2B en las células es limitante con respecto a eIF2, de tal manera que pequeños incrementos en la fosforilación de eIF2 son suficientes para secuestrar al factor eIF2B causando una severa inhibición de la síntesis de proteínas ^{5,30}.

Al inhibirse la fase de iniciación, el proceso de traducción es bloqueado, sin embargo, existe un nivel de traducción basal en el cual, algunos mRNAs se pueden traducir. Actualmente, se sabe que los mRNAs que codifican para las proteínas celulares GCN2 y ATF4 se traducen aún cuando eIF2 α está fosforilado²⁶, estos transcritos contienen varios ORFs río arriba del AUG de iniciación^{26,31}; también, se ha observado que mRNAs con IRES pueden ser traducidos en estas condiciones, sin embargo, no todos los mRNAs con IRES logran escapar a la inhibición traduccional cuando eIF2 α se encuentra fosforilado. Por ejemplo, se determinó que el IRES del mRNA de cat-1 (cationic amino acid transporter) y el del virus de la parálisis del grillo aumentan su traducción, mientras que el IRES del mRNA de la chaperona BiP y el de la cinasa Pim-1 no presentan estimulación en las mismas condiciones^{32,33}. Es importante mencionar que los mRNAs que son traducidos cuando eIF2 α está fosforilado, escapan del secuestro en gránulos de estrés por un mecanismo que aún no es conocido (ver mas adelante)^{2,34}.

Existen cuatro cinasas celulares que pueden fosforilar a eIF2 α bajo diferentes condiciones de estrés, estas son: la PKR (Protein Kinase Represor), que se activa por la presencia de RNA de doble cadena en la célula; GCN2, la cual responde a tRNAs no cargados por ausencia de aminoácidos; HRI, la hemo- represor cinasa, que se activa en condiciones de deficiencia de hierro intracelular o durante choque térmico (heat shock) y PERK (PKR-like ER Kinase) la cual es activada cuando las chaperonas del retículo endoplásmico están saturadas o por un exceso de proteínas mal plegadas. En todos estos casos, la activación de estas cinasas tienen como consecuencia la fosforilación de eIF2 α y por lo tanto, la inhibición de la síntesis de proteína celular³⁵⁻³⁷. Es importante mencionar que, la activación de cada una de estas cinasas puede responder a condiciones diferentes a

las que se han planteado, por ejemplo, recientemente se ha descrito que la cinasa GCN2 o PERK también se pueden activar durante infecciones virales^{38,39}, y sin embargo, anteriormente se creía que sólo PKR se activaba en estas condiciones.

Existe un factor de iniciación conocido como eIF2A, el cual es capaz de acarrear al tRNA-met_i al codón de inicio de una manera codón-dependiente a diferencia de eIF2, el cual para unirse al tRNA-met_i depende de su unión a GTP. eIF2A es una proteína de 65 kDa cuya vida media es sólo de aproximadamente 17 minutos. Estudios sobre la función de eIF2A y eIF2, mostraron que eIF2 y no eIF2A es el factor que principalmente acarrea al tRNA-met_i durante la fase de iniciación⁴⁰.

PKR y su respuesta a la infección por virus

PKR es una cinasa que se dimeriza y activa por autofosforilación cuando el dominio amino terminal se une a un RNA de doble cadena (dcRNA) de una longitud mayor a 30 pb. En condiciones normales, PKR se encuentra unida a ribosomas, principalmente a la subunidad pequeña 40S y se ha encontrado en el núcleo cuando se sobre-expresa con plásmidos. La activación de PKR tiene múltiples funciones, sin embargo, las más caracterizadas tienen que ver con la defensa celular contra la infección por virus. En relación a este último punto, PKR es una cinasa que fosforila al factor de iniciación eIF2 α inhibiéndose la síntesis de proteínas virales y provocando apoptosis, lo que evita la replicación viral; además, y como parte de las funciones antivirales de PKR, induce la transcripción de los genes de interferón (IFN)⁴¹⁻⁴³.

Respuesta de interferón vía PKR

Los IFNs son una familia de citocinas que poseen actividad antiviral, comúnmente se agrupan en dos tipos: el tipo I son conocidos como IFNs virales (IFN- α , IFN- β e IFN- ω) y los tipo II conocidos como IFNs inmunes (IFN- γ). Los IFN tipo I son inducidos por infecciones virales y los tipo II se inducen en respuesta a mitógenos o estímulos antigénicos. La transcripción de los IFNs- α/β es controlada por proteínas conocidas como IFN regulatory factors (IRF), en particular por los factores IRF-3 e IRF-7 que son activados durante infecciones virales. La función de los IFN tipo I es evitar la replicación tanto de virus de RNA o de DNA e interesantemente, lo pueden llevar a cabo en la célula infectada en la cual fueron estimulados o bien, en la célula vecina preparándola contra la presencia de algún virus a través de la inducción de la expresión de genes como RNAsa L, 2'-5' oligoadenilato sintetasa y la misma PKR, dando como resultado el bloqueo de la expresión génica viral a diferentes niveles, incluyendo la transcripción y traducción, así como la degradación de los transcritos virales. Dada la gran importancia del IFN sobre la replicación viral, algunos virus han evolucionado mecanismos para evitar la respuesta celular de IFN, no solo evitando la activación de PKR, si no evitando también la activación transcripcional de genes de IFN⁴⁴⁻⁴⁶.

Defosforilación de eIF2 α

La célula tiene varios mecanismos de recuperación ante el estrés. Uno de estos mecanismos involucra la síntesis de un factor transcripcional conocido como ATF4, el cual promueve la transcripción y traducción del mRNA de la proteína GADD34, esta proteína se

une a la subunidad catalítica la fosfatasa celular PP1 y promueve que la subunidad α del factor eIF2 sea fosfatada, recuperándose la síntesis de proteína celular⁴⁷. La defosforilación de eIF2 α por PP1, es relativamente rápida, se ha determinado que este evento se realiza en 1 a 2 horas dependiendo del tiempo y tipo de estrés. Por ejemplo, se encontró que cuando la célula es estresada con tapsigargina, una droga que causa estrés de retículo endoplásmico, activándose PERK, la fosforilación de eIF2 α se observa a los 60 min post-tratamiento y la defosforilación de este factor se observa a las 4 h después del tratamiento. Por otro lado, cuando se activa a la cinasa GCN2 por depleción de aminoácidos, eIF2 α se fosforila a los 30 min y se observa su defosforilación 2 h después; interesantemente, cuando las células son estresadas con un poli (IC) que simula un RNA de doble cadena y que activa a PKR, eIF2 α se fosforila pero no se defosforila^{32,35} lo que es consistente con el hecho de que una de las actividades de PKR es de llevar a la célula apoptosis a través de mantener la fosforilación de este factor⁴³.

Gránulos de estrés

Uno de los eventos que ocurre como respuesta al estrés y a la fosforilación del factor eIF2 α , es la formación de partículas citoplásmicas densas conocidas como gránulos de estrés (SG: stress-granules) en los cuales la traducción celular es arrestada (Fig. 2). Por ensayos de inmunofluorescencia y haciendo uso de microscopía se ha observado que los gránulos de estrés están formados por el complejo 48S que contiene, básicamente la subunidad ribosomal pequeña, factores de iniciación y mRNAs. Entre las proteínas que se han encontrado en estas estructuras están la PABP, los factores de iniciación eIF3, eIF4G, eIF4E, eIF2 α fosforilado y dos proteínas celulares conocidas como TIA (T cell internal

antigen-1) y TIAR (TIA-1 related protein). Se ha propuesto que estas dos últimas proteínas se relocalizan del núcleo al citoplasma, para formar los SGs en respuesta a la fosforilación de eIF2. La formación de gránulos de estrés es reversible en células que se recuperan de un estrés sub-lethal y es importante mencionar que la disolución de estos gránulos correlaciona con la defosforilación de eIF2 α ^{2,34,48-50}. Inicialmente, se había propuesto que TIA-1 era la proteína responsable de la formación de gránulos de estrés en respuesta a la fosforilación de eIF2 α , sin embargo, recientemente se ha observado que se pueden formar gránulos de estrés en células donde la expresión de esta proteína ha sido silenciada⁵¹, sugiriendo que TIA-1 no es la única proteína responsable de la formación de estos gránulos. La misma observación se obtuvo en células en las que el gene de TIA-1 fue inactivado (knock-outs), sin embargo, en este trabajo se propuso que la proteína TIAR podría sustituir la función de TIA-1 aunque esto no ha sido demostrado⁵².

Recientemente, Kedersha y colaboradores encontraron que el tratamiento de células con Pateamina A, induce la formación de gránulos de estrés a pesar de que eIF2 α no se fosforila. Esta droga se caracteriza por inhibir la síntesis de proteína celular al interferir con la función del complejo eIF4F, específicamente con la proteína eIF4A: la helicasa de este complejo⁵³. Este hallazgo ha llevado a proponer que el mecanismo de la formación de gránulos de estrés podría responder a una vía de señalización independiente de la fosforilación del factor eIF2 α y es probable que esta vía responda a la no funcionalidad del complejo eIF4F⁵². Esta nueva ruta de formación de gránulos de estrés fue corroborada en estudios en donde se encontró que al silenciar la expresión de eIF4A, se forman gránulos de estrés aún a pesar de que el factor eIF2 α no este en su estado fosforilado⁵⁴.

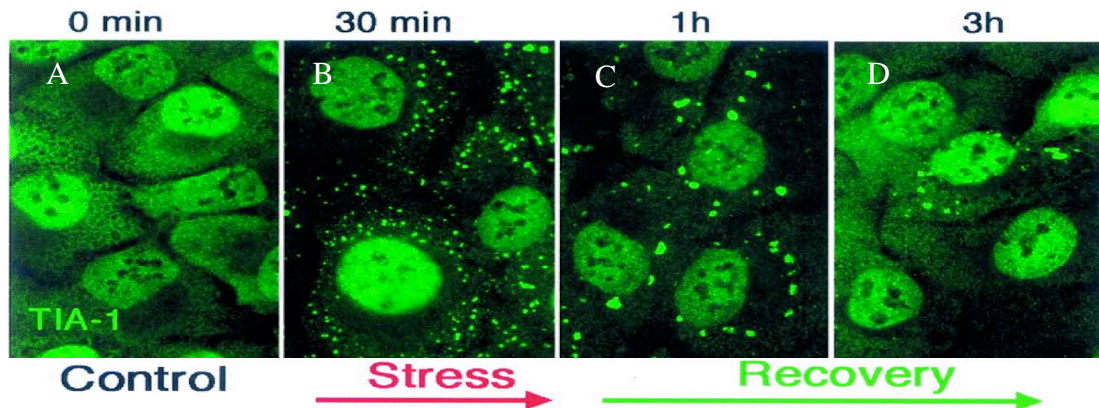


Figura 2. La proteína TIA-1 forma gránulos de estrés, los cuales son disueltos cuando las células se recuperan del estrés. La foto muestra la tinción de TIA-1 A) células no tratadas y B) células tratadas con arsenito de sodio por 30 min, C) y D) muestran la disolución de los gránulos de estrés (Tomado de ²).

Regulación del inicio de la traducción por virus

Como mencionamos anteriormente, los virus son parásitos intracelulares obligados, ya que su genoma no codifica para todos los componentes necesarios para su replicación. Los virus dependen principalmente de la maquinaria de síntesis de proteína celular para la producción de sus proteínas y han desarrollado mecanismos sofisticados para asegurar la traducción de sus mRNAs.

Dado que la regulación de la traducción celular se lleva a cabo principalmente en la fase de inicio, es en éste punto donde los virus han desarrollado diversas estrategias para controlar la síntesis de proteínas. A continuación se hará una breve descripción de algunos mecanismos de regulación empleados por los virus durante la infección.

Regulación de la síntesis de proteína por alteración del complejo de inicio eIF4F

Se sabe que los virus de diferentes familias son capaces de inhibir la traducción cap-dependiente al alterar el complejo de inicio de la traducción eIF4F, y en estos casos, los mRNAs virales son traducidos eficientemente mediante mecanismos de iniciación poco comunes y diferentes a los observados para los mRNAs celulares. Algunos virus emplean mecanismos de inicio de traducción en los cuales no utilizan, o reducen la utilización, de los factores del complejo eIF4F y en la mayoría de los casos, estos virus inactivan uno o más componentes de este complejo proteico siendo los principales blancos eIF4E y eIF4G^{1,55}.

eIF4E: Un ejemplo de la regulación de la traducción vía eIF4E por virus, se observa durante la infección por adenovirus. Este virus inhibe la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares y promueve eficientemente la traducción de los mRNAs virales en la fase tardía de la infección, por un mecanismo que involucra la defosforilación de eIF4E. Este evento ha sido ampliamente estudiado y se encontró que el genoma de este virus codifica para una proteína llamada 100K, la cual se une a eIF4G evitando la unión de este factor con la cinasa de eIF4E, MnK. Así, el factor eIF4E no es fosforilado, inhibiéndose la síntesis de proteína celular. Por otra parte, los mRNAs de adenovirus se traducen eficientemente gracias a que contienen una secuencia líder en la región 5' no traducida (5' UTR) característica de todos los mRNAs virales tardíos y se ha propuesto que esta secuencia es capaz de reclutar al complejo 43S por apareamiento de bases entre el mRNA viral y el rRNA de la subunidad ribosomal 40S^{56,57}.

Un segundo ejemplo de la regulación de eIF4E empleada por virus es a través de la regulación por las 4EBPs. Un ejemplo bien caracterizado de esta estrategia se ha observado en células infectadas por el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y poliovirus (PV), donde la proteína 4EBP-1 es defosforilada, esto permite su interacción con el factor eIF4E y consecuentemente, no se forma el complejo eIF4F inhibiéndose la síntesis de proteína celular ⁵⁸. Los mRNAs de ambos virus, poseen estructuras IRES que les permiten una eficiente traducción independiente de la formación del complejo eIF4F (revisado en ^{59,60}). De manera similar, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) induce la defosforilación de eIF4E y de 4EBP-1, estos dos eventos correlacionan con la inhibición de la síntesis de proteína celular observada en las células infectadas con VSV ⁶¹.

Interesantemente, existen casos en los que los virus regulan de manera positiva la formación del complejo eIF4F, por ejemplo, se encontró que durante la infección con el virus herpes simplex (HSV-1), el producto génico viral ICP0 favorece la degradación de 4EBP-1 vía proteosoma evitando su interacción con eIF4E. Por otra parte, se determinó que en las células infectadas el factor eIF4E se encuentra fosforilado y esta fosforilación favorece la replicación viral, ya que la inactivación de la cinasa Mnk1, ocasiona una disminución de la traducción y replicación viral, sugiriendo que la fosforilación de eIF4E por MnK1 es importante en estos eventos. A pesar de que durante la infección con HSV-1 se favorece la formación del complejo eIF4F, se observa una síntesis preferencial de proteínas virales comparada a la síntesis de proteínas celulares. El mecanismo por el cual los mRNAs de este virus son preferencialmente traducidos no es bien conocido aún, sin embargo, se sabe que la poza de mRNAs celulares es depletada en células infectadas con

este virus, dando la posibilidad de que la eficiente síntesis de proteína viral sea consecuencia de la abundancia relativa de estos sobre los mRNAs celulares ⁶².

Finalmente, el mecanismo de traducción utilizado por los mRNAs de influenza, es muy particular. En células infectadas con este virus, se ha encontrado que existe una disminución en la transcripción celular, además de que hay una degradación selectiva de los mRNAs celulares, sumado a la defosforilación de eIF4E; se sugiere que estos eventos conllevan a la inhibición de la síntesis de proteína celular. Por otra parte, los mRNAs de este virus se caracterizan por poseer UTRs 5' muy cortas, que le permiten ser independientes de eIF4A (con actividad helicasa) y por consiguiente del complejo eIF4F, aún sin poseer un IRES. Esta estrategia es semejante a lo que sucede en la mayoría de los casos de virus en los que la traducción de sus transcritos es independiente del complejo eIF4F. Es importante mencionar que se ha sugerido que la traducción de los mRNAs de influenza es estimulada por la unión de la proteína celular GRSF-1 a la UTR 5', ya que esta proteína celular se une sólo a los UTRs de influenza y no a los celulares, además de haberse caracterizado como una proteína que puede estimular la traducción (revisado en ⁶).

eIF4G: El mecanismo de regulación traduccional que actualmente se ha descrito a través de este factor, es el que se observa durante la infección por picornavirus [excepto el virus de la hepatitis A (HAV)] como poliovirus, rinovirus (HRV) y coxsackievirus. Durante la infección con estos virus, se inhibe la síntesis de proteína celular y los mRNAs virales se traducen de una manera muy eficiente. Estos virus, codifican una proteasa conocida como 2Apro que corta específicamente a los factores eIF4GI, eIF4GII y PABP inhibiendo la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares. Los mRNAs virales se

traducen de manera dependiente de IRES que como se mencionó anteriormente, dirigen la unión del mRNA al ribosoma de manera independiente al complejo eIF4F^{63,64}.

El estudio de la regulación traduccional durante las infecciones con estos virus ha permitido realizar observaciones muy interesantes como el hecho que la inhibición de la síntesis de proteínas celulares en células infectadas correlaciona con el corte proteolítico de eIF4GII y no de eIF4GI sugiriendo un papel diferencial entre ambas isoformas del factor eIF4G⁶⁵.

No sólo las proteasas codificadas por picornavirus cortan al factor eIF4G, actualmente se sabe que los virus de la familia *Retroviridae* (HIV-1 y 2, human T-cell leukemia virus-1, moloney murine leukemia virus (MoMLV)), también codifican para una proteasa capaz de cortar a eIF4GI y II⁶⁶.

Regulación de la fosforilación de eIF2 durante infecciones virales

Como se mencionó anteriormente, PKR es la principal cinasa que se activa durante infecciones virales llevando a la inactivación del factor traduccional eIF2 (por fosforilar a la subunidad α) y a la activación de IFN. Dado el efecto negativo sobre la replicación viral que se presenta durante la activación de PKR, los virus han desarrollado diferentes estrategias para evitar o que eIF2 α sea fosforilado o que los IFNs sean activados, asegurando así la replicación viral. Es importante mencionar que existe una gran diversidad de estrategias para evitar que la PKR sea activada durante la infección, a continuación se mencionan algunos ejemplos (revisados en^{6,42,63}):

i) Evitar la unión de PKR con el dcRNA, dado que la activación de PKR depende de su unión al dcRNA algunas proteínas virales se unen ya sea a PKR o al dcRNA enmascarándolo; ejemplos de virus que emplean esta estrategia son el virus de la influenza y el virus de vaccinia.

ii) Evitar la dimerización de PKR. Virus como hepatitis C (HCV), herpes virus-8 y baculovirus *Autographa californica* emplean como estrategia el codificar por una proteína viral que se une a PKR evitando su dimerización.

iii) Bloquear la interacción de PKR con su sustrato: eIF2 α . Durante la infección con el virus de vaccinia se sintetiza una proteína viral conocida como K3L y ha sido demostrado que funciona como pseudo-sustrato de PKR. Varios *Ranavirus* contienen un gen que codifica para un homólogo del factor eIF2 α , de tal manera que PKR se une preferencialmente a estas proteínas virales y consecuentemente, eIF2 α no es fosforilado.

iv) Degradación de la PKR. Poliovirus induce la rápida degradación de esta cinasa. A pesar de que poliovirus codifica para diferentes proteasas, se piensa que la proteína que degrada a PKR durante la infección con poliovirus, es una proteasa celular y no viral, sin embargo, esto aún no ha sido demostrado.

v) Regulando la fosforilación de eIF2 α , ya sea evitando que eIF2 α sea fosforilado al actuar como sustrato similar o bien, activando a la fosfatasa PP1. Por ejemplo, Herpes virus codifica para la proteína $\gamma_134.5$, la cual es similar a la proteína celular GADD34. Durante la infección, $\gamma_134.5$ se une a PP1 en lugar de GADD34 manteniendo activa a esta fosfatasa y como resultado eIF2 α no se encuentra fosforilado.

A pesar de la existencia de una gran diversidad de mecanismos que evitan la activación de PKR, recientemente, se han descrito casos en donde algunos mRNAs virales pueden ser traducidos aún independiente del estado de fosforilación de eIF2 α . Estos virus son resistentes a la fosforilación de eIF2 α y pueden emplear estrategias que les permiten escapar de la respuesta de IFN, ya sea vía PKR o alterando eventos río debajo de la vía de IFN.

Virus de la parálisis del grillo

El estudio del mecanismo de traducción de los mRNAs de este virus revolucionó el paradigma que se tenía acerca del mecanismo convencional de síntesis de proteínas ya que fue el primer caso de un virus en el que se inhibe la síntesis de proteína celular a través de la fosforilación de eIF2 α , lo cual era lo contrario a lo que la mayoría de los virus evitan. Este virus tiene un genoma de RNA de polaridad positiva que se caracteriza por ser bicistrónico. El primer ORF (Open Reading Frame) o marco de lectura abierto está seguido por una región intergénica (IGR) de 200 nt la cual funciona como un IRES con la característica de reclutar a las subunidades ribosomales 40S y 60S sin la participación de

algún factor canónico de iniciación, incluyendo al tRNA-met. Interesantemente, se encontró que el IGR de este virus, presenta una estructura secundaria que mimetiza al tRNA iniciador el cual se posiciona en el ribosoma, iniciando la síntesis de proteína viral con alanina y no con metionina como usualmente sucede. Estudios recientes muestran que el factor eIF2 α se encuentra fosforilado en células infectadas con este virus cuando el segundo cistron de su genoma esta en su máxima expresión. La eficiente traducción de este ORF cuando eIF2 α está fosforilado sugiere que este virus ha evolucionado un mecanismo que le asegura la eficiente síntesis de sus proteínas tardías, cuando la cantidad del complejo ternario es limitante ^{1,67}.

Alfavirus

Durante la infección de Semliki forest virus (SFV) un alfavirus, se induce la fosforilación de eIF2 α , la cual favorece la inhibición de la síntesis de proteína celular durante la infección. Actualmente se desconoce el mecanismo utilizado por los mRNAs de este virus para traducirse en estas condiciones, sin embargo, se encontró que estos mRNAs virales contienen un enhancer traduccional que es funcional en condiciones de estrés, cuando eIF2 α se encuentra en su estado fosforilado. Consistente con la fosforilación del factor eIF2 α , se observó que en células infectadas con este virus se forman SGs, los cuales son disueltos a tiempos tardíos de la infección cuando inicia la replicación viral ⁶⁸.

Otro alfavirus que se ha descrito como un virus que durante su infección favorece la fosforilación de eIF2 α , es el virus de Sindbis (SV). Los mRNAs de este virus utilizan al factor eIF2A en lugar de eIF2 α como el acarreador del tRNA-met, al codón de inicio, permitiendo la traducción cuando eIF2 α está fosforilado ⁶⁹.

Reovirus

La infección con reovirus induce la fosforilación del factor eIF2 α , sin embargo, no se sabe el mecanismo por el cual sus mRNAs pueden ser traducidos en estas condiciones. En respuesta a la fosforilación de eIF2 α , también se observó la formación de SGs en células infectadas al igual que en las células infectadas por SFV ⁷⁰.

Hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) también induce la fosforilación del factor eIF2 α durante la infección. Los mRNAs de este virus se traducen eficientemente debido a que el complejo 43S es reclutado al mRNA viral mediante la interacción que se establece entre la UTR 5' del mRNA del virus con proteínas ribosomales de la subunidad ribosomal 40S y no necesita ningún factor de iniciación del complejo eIF4F, sin embargo, se desconoce cómo puede utilizar al factor eIF2 α a pesar de su estado fosforilado ^{71,72}.

Rotavirus

Generalidades

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae* y fueron descritos inicialmente por Ruth Bishop y colaboradores en Australia en 1973¹⁰⁴. Estos virus fueron encontrados en heces de niños que cursaban diarrea de origen no bacteriano que cuando fueron observadas al microscopio electrónico presentaban partículas virales con una apariencia de rueda, de ahí que se les denominó rotavirus, del latín rota que quiere decir rueda¹⁰³.

Se estima que la diarrea por rotavirus es la causa de 2 millones de hospitalizaciones y la muerte de entre 352,000 - 592,000 niños al año⁷³. El pico de incidencia de infección se observa en niños de entre 6 y 24 meses de edad; y se estima que a la edad de 5 años el 95% de los niños ya han sido infectados por este virus. La infección se puede presentar en adultos y por lo regular es asintomática. La época en que se observa mayor número de casos infecciosos es durante los meses de otoño e invierno en países con clima templado, sin embargo, en países con clima tropical, esta estacionalidad es menos marcada¹⁰⁵.

Los síntomas que se presentan durante la infección por rotavirus son: más de 8 evacuaciones al día, vómito y fiebre. Su duración promedio es de 5 días y la gran mortalidad asociada a esta enfermedad es debido a la fuerte deshidratación que provoca la infección, por lo que es muy importante hidratar a los niños para mantener su equilibrio electrolítico. El diagnóstico se debe realizar mediante detección directa del virus, ya que los signos de la infección no son lo suficientemente distintos a lo observado por infecciones

con otros microorganismos. Las pruebas utilizadas para la detección del virus son inmunoensayos o por electroforesis del genoma viral ¹⁰⁶.

La principal ruta de transmisión de este virus es la vía fecal-oral, sin embargo, el contacto con superficies contaminadas puede ser una fuente de transmisión, al igual que el contacto persona a persona o con las secreciones respiratorias de los niños infectados. Las partículas del virus son estables, ya que se pueden mantener por meses a 4°C y su funcionalidad se mantiene en un rango de pH de 3-9, sin embargo, pierden su infectividad con desinfectantes como formalina, cloro y etanol al 95% ⁷⁴. No se ha documentado la infección en el hombre por cepas que infectan animales, es decir, la infección por rotavirus es especie-específica ⁷⁵.

Genoma viral

El genoma de rotavirus está constituido por once segmentos de dcRNA que varían en su tamaño, desde una longitud de 660 hasta 3300 pares de bases (pb), lo que permite que puedan ser separados por electroforesis presentando un patrón característico, que sirve como diagnóstico de la infección (Fig. 3A).

Una vez que el virus ha entrado a la célula, se activa la transcripción del genoma lo que da lugar a los mRNAs que funcionan como moldes para la síntesis del dcRNA o bien dirigen la síntesis de proteínas virales. Cada segmento de dcRNA codifica para una proteína, excepto el segmento 11 que codifica para dos proteínas; dando como resultado la expresión de doce proteínas, de las cuales, seis forman parte de la partícula viral llamados VP por Viral Protein: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y seis son no estructurales (NSP por Non Structural Protein): NSP1 a NSP6 (Fig. 3B) ⁷⁶.

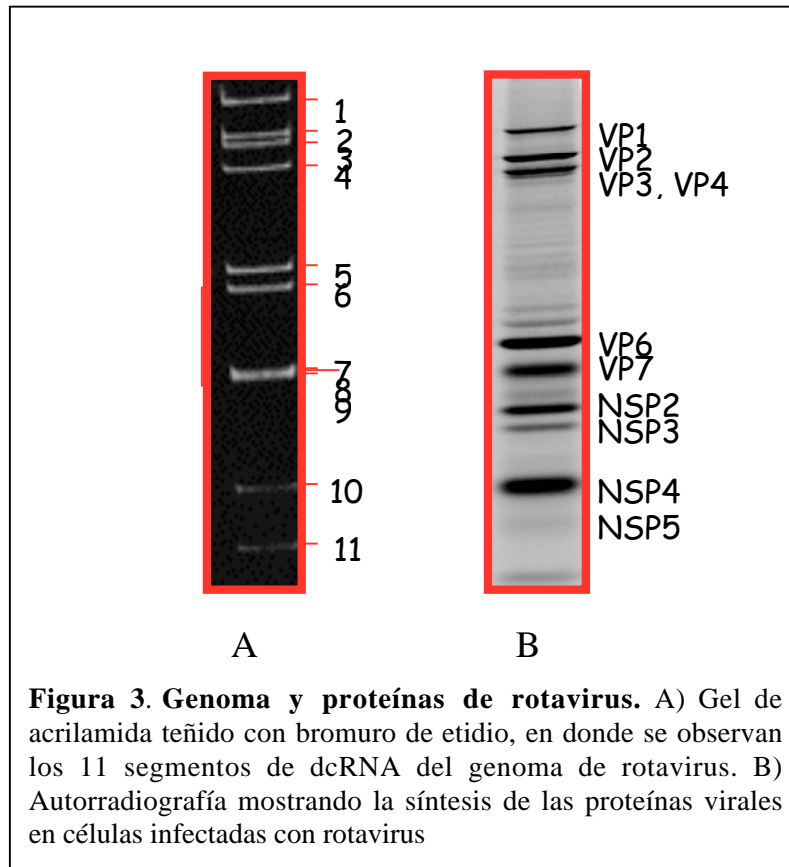


Figura 3. Genoma y proteínas de rotavirus. A) Gel de acrilamida teñido con bromuro de etidio, en donde se observan los 11 segmentos de dsRNA del genoma de rotavirus. B) Autorradiografía mostrando la síntesis de las proteínas virales en células infectadas con rotavirus

Los mRNAs de rotavirus se caracterizan por poseer una estructura cap en el extremo 5', seguida de una región 5' no traducida en donde se encuentra una secuencia conservada en todos los transcritos virales; un ORF que codifica para la proteína viral seguido de una UTR 3' no poliadenilada, que también posee una secuencia conservada en todos los transcritos virales (Fig. 4)⁷⁷⁻⁷⁹.

Las UTRs de los transcritos virales varían en longitud entre 9-49 nucleótidos en el extremo 5' y de 17 a 182 nucleótidos en el extremo 3'. A pesar de la diferencia en tamaño

de las UTRs, estas regiones se consideran pequeñas en comparación a las que se encuentran en los mRNAs celulares que en promedio tienen 200 nucleótidos.

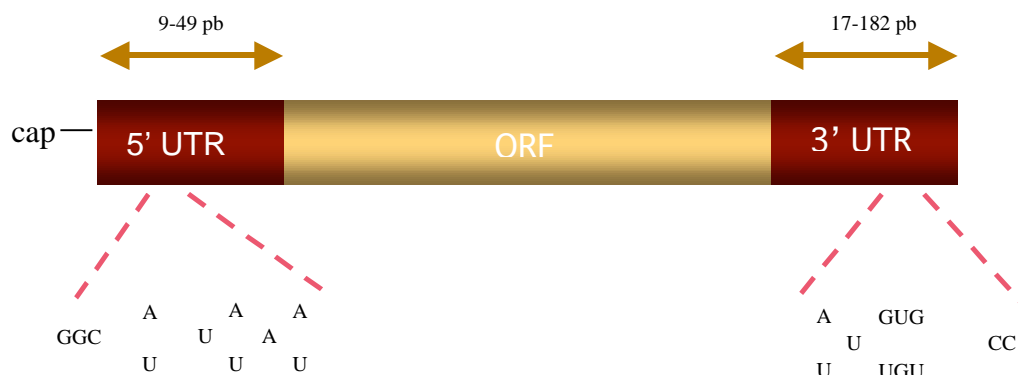


Figura 4. Características de un mRNA de rotavirus. El extremo 5' con la estructura cap, región 5' no traducida (UTR), indicándose la secuencia conservada, ORF: marco de lectura abierto UTR 3' y secuencia conservada en este extremo.

Características de la partícula viral

En general, la partícula viral está formada por las proteínas que son necesarias para dar inicio al ciclo replicativo. En el caso de rotavirus, la partícula viral contiene las proteínas VP1 y VP3 que se han caracterizado como la transcriptasa y la guanililtransferasa virales, respectivamente⁸⁰; estas dos proteínas son las encargadas de iniciar la transcripción del genoma que dará lugar a los mRNAs virales y a su vez, a la síntesis de proteína viral.

Existen tres tipos de partículas: la nucleocápside, formada por la proteína viral VP2, que rodea al genoma y a las proteínas VP1 y VP3. Un segundo tipo de partícula es denominada DLP (Doble-Layered Particle), que se caracteriza por ser la partícula transcripcionalmente activa y que está formada por la nucleocápside rodeada por la proteína viral VP6. Finalmente, la partícula viral infecciosa, también denominada TLPs (Triple-

Layered Particle), está formada por tres capas de proteína en donde la capa externa está formada por la proteína VP4 y la glicoproteína VP7 (Fig. 5) ⁶.

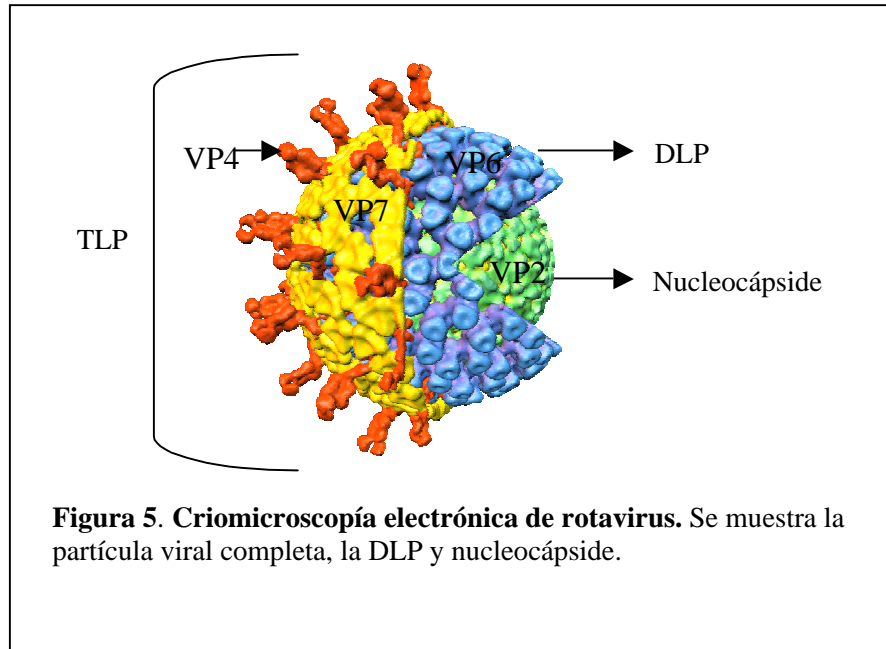


Figura 5. Criomicroscopía electrónica de rotavirus. Se muestra la partícula viral completa, la DLP y nucleocápside.

Función de las proteínas virales

Durante el ciclo replicativo, en la célula infectada se sintetizan proteínas y nuevos genomas virales para la formación de nueva progenie viral. Como mencionamos anteriormente, las partículas virales contienen a las proteínas necesarias para dar inicio a la replicación viral, así como aquellas que se necesitan para la traducción de sus mRNAs. Conforme avanza el ciclo replicativo y se sintetizan las proteínas virales, éstas ayudan a la formación de las nuevas partículas. Interesantemente, a pesar de que su genoma codifique para pocas proteínas, estas son capaces de realizar todas las funciones necesarias para su replicación por realizar más de una función.

A pesar de la importancia a nivel salud que tiene estos virus, es poco el conocimiento que se tiene acerca de cómo se lleva a cabo el ciclo replicativo de rotavirus. Varios grupos de investigación están interesados en conocer las funciones de sus proteínas virales, sin embargo, este objetivo se ha visto frustrado al no contar aún con un sistema de genética reversa que permita el estudio de cada una de estas proteínas.

En los últimos 5 años, se ha logrado un avance importante en el conocimiento de la función de cada una de las proteínas de rotavirus gracias al empleo de la técnica de RNA de interferencia, la cual permite el silenciamiento postranscripcional de un gene. Empleando esta técnica, se ha estudiado el efecto de la ausencia de la proteína viral de interés en el contexto de una infección. A continuación, se presenta una tabla (Tabla 1) donde se indica la principal función de cada una de las proteínas de rotavirus (tomado de ^{6,78,81}).

Proteína viral	Función	Unión a RNA viral	Modificación post-traducciona
<i>VP1</i>	Polimerasa	Región 3' del ssRNA	
<i>VP2</i>	Forma la nucleocápside	dcRNA y ssRNA	
<i>VP3</i>	Guanililtransferasa	dcRNA	
<i>VP4</i>	Forma espículas de la capa externa. Importante en la interacción con receptores	No se une	
<i>VP6</i>	Forma la capa intermedia	No se une	
<i>VP7</i>	Proteína de capa externa	No se une	Glicosilación
<i>NSP1</i>	Interfiere en la respuesta celular de interferón	Extremo 5' pero no está bien documentado	
<i>NSP2</i>	Importante en la formación de viroplasma	Inespecífica	
<i>NSP3</i>	Regulación traduccional	Extremo 3' de ssRNA	
<i>NSP4</i>	Toxina viral. Importante en morfogénesis	No se une	Glicosilación
<i>NSP5</i>	Importante en la formación de viroplasma	Inespecífica	Fosforilación
<i>NSP6</i>	Desconocida	No se une	

Tabla 1. **ss:** cadena sencilla, **dc:** cadena doble

En general, las proteínas no estructurales tienen diversas funciones en el ciclo replicativo de rotavirus, aunque la función precisa de todas ellas no se conoce aún. A excepción de la proteína no estructural NSP4, todas se unen a RNA, ya sea de cadena sencilla o de cadena doble. NSP5 es una fosfoproteína cuya función no es clara, sin embargo, se sabe que NSP5 junto con NSP2 forman estructuras electrodenudas en el citoplasma celular conocidas como viroplasmos (Fig. 6), lugar en donde se forman las partículas de doble capa y se replica el RNA viral, para posteriormente gemar al interior del retículo endoplásmico donde adquieren la tercera capa, dando lugar a la partícula viral completa^{82,83}.

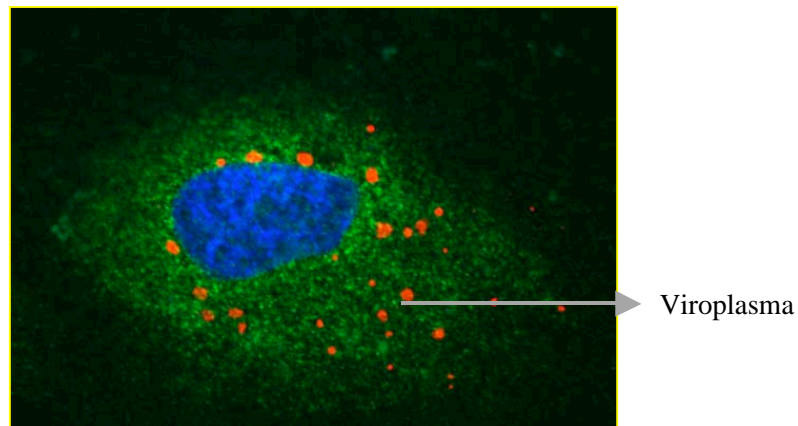


Figura 6. Microscopía de inmunofluorescencia de células infectadas. Las células fueron teñidas con anticuerpos dirigidos contra: NSP5 (rojo), la proteína ribosomal S6 (verde) que muestra una distribución citoplásmica y el núcleo teñido con DAPI (azul).

Una vez que un virus infecta una célula, pueden ocurrir múltiples cambios en esta, en el caso de rotavirus se ha observado que conforme avanza la infección, la síntesis de proteína celular disminuye considerablemente, mientras que, la síntesis de proteína viral es muy eficiente. Este fenotipo se le ha atribuido a la proteína no estructural NSP3 que se caracteriza por unirse específicamente al extremo 3' de los mRNAs virales e interactuar con el factor de inicio de la traducción eIF4GI. NSP3 fue uno de nuestros objetos de estudio debido a que se le ha atribuido ser la proteína viral responsable de la regulación traduccional tanto viral como celular, como abordaremos posteriormente ⁸⁴⁻⁸⁶.

Ciclo replicativo

Una vez que el virus ha entrado a su célula huésped, mediante un proceso aún no bien caracterizado, pierde la capa externa dando lugar a la DLP, partícula transcripcionalmente activa. La transcripción se inicia rápidamente y a una hora post-infección (h p.i.) los transcritos virales ya pueden ser detectados ⁸⁷. Los mRNAs de rotavirus son traducidos y las proteínas virales NSP2, NSP5, VP2, VP1, VP3 y VP6 se acumulan en el citoplasma formando los viroplasmos ^{88,89}, sitio en donde se sintetiza el dcRNA a partir de los mRNAs virales de polaridad positiva ⁹⁰. En los viroplasmos se forman las partículas de dos capas ^{89,91}, estas geman hacia el lumen del retículo endoplásmico adquiriendo una capa lipídica que es removida en este organelo; finalmente, se adiciona la tercera capa para formar la partícula completa. El virus es liberado de la célula mediante lisis celular a través de un proceso que aún no es bien conocido (Fig. 7).

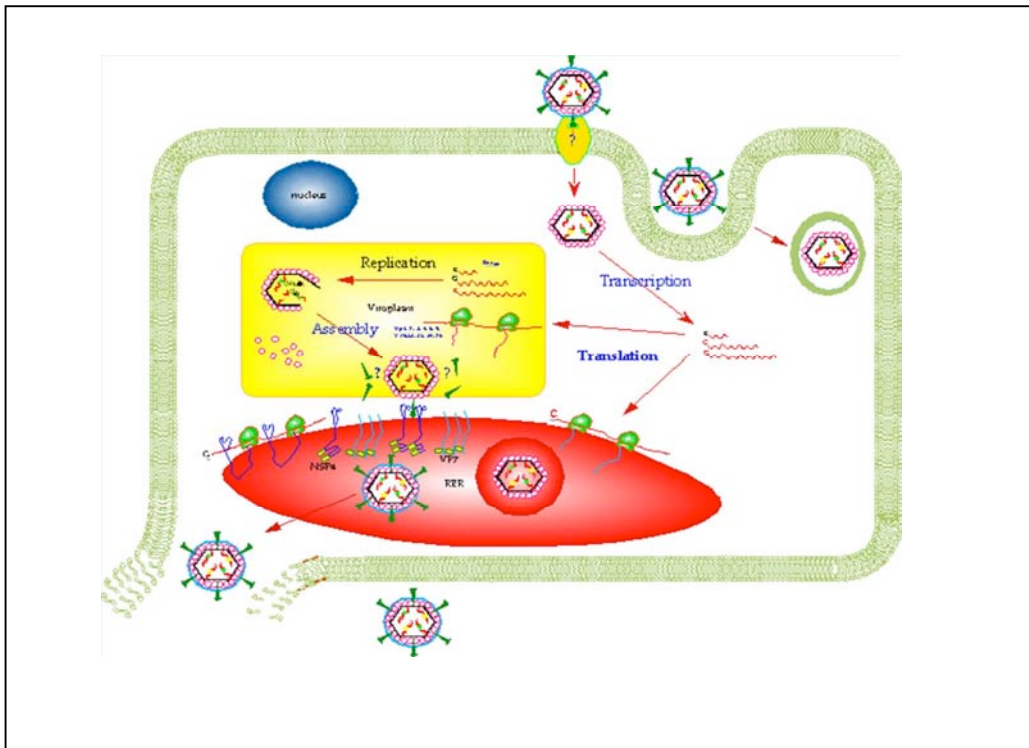


Figura 7. Ciclo replicativo de rotavirus

Mecanismo propuesto para la regulación de la síntesis de proteína durante la infección por rotavirus

Como se mencionó anteriormente, los mRNAs de rotavirus se caracterizan por tener cap en el extremo 5' y carecer de poli-A en su extremo 3'. Durante la infección con este virus, se puede observar que hay una severa reducción de la síntesis de proteína celular y una eficiente traducción de los mRNAs virales. Se ha propuesto que la proteína viral no estructural NSP3 es la responsable de tal efecto. NSP3 tiene un dominio de unión a RNA que reconoce específicamente a la secuencia 3' terminal GACC que está conservada entre

todos los mRNAs virales; además, NSP3 tiene un dominio de unión a eIF4GI cuya interacción se lleva a cabo en la misma región en donde se une PABP a eIF4GI. En estudios *in vitro*, se ha observado que NSP3 es capaz de desplazar a PABP de su sitio de unión a eIF4GI y se ha propuesto que NSP3 es la responsable de inhibir la síntesis de proteína celular durante la infección por rotavirus por evitar la interacción PABP-eIF4GI e interrumpir la pseudo-circularización de los mRNA celulares y así, favorecer la pseudo-circularización de los mRNA virales mediante la interacción 3' mRNA viral- NSP3-eIF4G-eIF4E- cap- 5' del mRNA viral (Fig. 8) ^{85,86,92-95}.

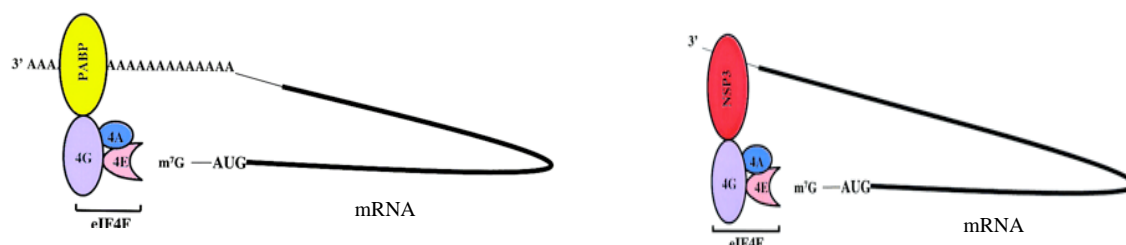


Figura 8. Desplazamiento de PABP por NSP3 ¹.

En el laboratorio se realizó el estudio de la función de las proteínas virales utilizando la técnica de RNA de interferencia. Como se mencionó anteriormente, los mRNAs de rotavirus poseen UTRs pequeñas lo cual podría favorecer su traducción independientemente del complejo eIF4F, de manera similar a la que emplean algunos virus como influenza (revisado en ⁶). Dadas estas observaciones, nos propusimos plantear la siguiente hipótesis y objetivos.

Hipótesis:

La inhibición de la síntesis de proteína celular en una infección por rotavirus se da a través de varios mecanismos que involucran, además de a NSP3 a otras proteínas del virus. Bajo estas condiciones de inhibición de la síntesis de proteína celular, la traducción de los mRNAs virales se da a través de un mecanismo muy eficiente que es diferente al mecanismo canónico utilizado por los mRNAs celulares.

Objetivo general

Estudiar la regulación de la síntesis de proteína celular y viral durante una infección por rotavirus.

Objetivos particulares:

- 1) Caracterizar el mecanismo a través del cual los rotavirus inhiben la síntesis de proteína celular.
 - 1.1 Estudiar el papel de NSP3 en la inhibición de la síntesis de proteína celular durante una infección con rotavirus.
 - 1.2 Determinar la importancia de la interacción de la proteína viral NSP3 con el factor de inicio de la traducción eIF4GI en la inhibición de la traducción de los mRNAs celulares.

- 1.3** Caracterizar el estado de fosforilación del factor de inicio eIF2 α en una infección por rotavirus.
 - 1.4** Determinar si alguna proteína viral contribuye a la inhibición de proteínas celulares al alterar el estado de fosforilación del factor eIF2 α .
 - 1.5** Estudiar la formación de gránulos de estrés durante la infección.
- 2)** Caracterizar los factores que permiten una traducción eficiente de los mRNAs virales en una célula infectada con rotavirus.
- 2.1** Estudiar la importancia de la proteína NSP3 en la síntesis eficiente de proteína viral durante la infección.
 - 2.2** Determinar la importancia del factor de inicio de la traducción eIF4GI en la traducción de los mRNAs virales.

Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 Is Not Required for Viral Protein Synthesis

Hilda Montero, Carlos F. Arias, and Susana Lopez*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received 1 March 2006/Accepted 26 June 2006

Initiation is the rate-limiting step in protein synthesis and therefore an important target for regulation. For the initiation of translation of most cellular mRNAs, the cap structure at the 5' end is bound by the translation factor eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), while the poly(A) tail, at the 3' end, is recognized by the poly(A)-binding protein (PABP). eIF4G is a scaffold protein that brings together eIF4E and PABP, causing the circularization of the mRNA that is thought to be important for an efficient initiation of translation. Early in infection, rotaviruses take over the host translation machinery, causing a severe shutoff of cell protein synthesis. Rotavirus mRNAs lack a poly(A) tail but have instead a consensus sequence at their 3' ends that is bound by the viral nonstructural protein NSP3, which also interacts with eIF4GI, using the same region employed by PABP. It is widely believed that these interactions lead to the translation of rotaviral mRNAs, impairing at the same time the translation of cellular mRNAs. In this work, the expression of NSP3 in infected cells was knocked down using RNA interference. Unexpectedly, under these conditions the synthesis of viral proteins was not decreased, while the cellular protein synthesis was restored. Also, the yield of viral progeny increased, which correlated with an increased synthesis of viral RNA. Silencing the expression of eIF4GI further confirmed that the interaction between eIF4GI and NSP3 is not required for viral protein synthesis. These results indicate that NSP3 is neither required for the translation of viral mRNAs nor essential for virus replication in cell culture.

As obligate intracellular parasites viruses depend on the cell translation machinery to synthesize their proteins, since this is a complex process that requires numerous components that exceed by far the coding capacity of viral genomes. The successful replication of viruses depends on the ability of viral mRNAs to outcompete cellular mRNAs for the use of the host translation apparatus. To achieve this, viruses have developed remarkable strategies to ensure the efficient translation of their mRNAs while simultaneously inhibiting cellular protein synthesis (reviewed in references 2 and 30).

Initiation is the rate-limiting step in protein synthesis and thus an important target for regulation. The critical step during translation initiation is the recruitment of the small 40S ribosomal subunit to the mRNA (7, 14), a process that involves the synergistic action of the 5'-cap structure and the poly(A) tail at the 3' end of most eukaryotic mRNAs (8, 20). The cap structure serves to recruit the eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F), a multiprotein complex composed of eIF4E, eIF4A, and eIF4G. eIF4E is the cap binding protein and also interacts with the amino-terminal region of eIF4G; eIF4A is an ATP helicase thought to unwind RNA secondary structures present near the 5' end of the mRNAs and associates with the middle region of eIF4G; eIF4G is a scaffolding protein that in addition to binding eIF4E and eIF4A also binds the poly(A)-binding protein (PABP), promoting the circularization of the mRNA molecule that is thought to be important for an efficient initiation of translation (15, 28, 33). There are two functional homologues of eIF4G in mammals, eIF4GI and eIF4GII, which are 46%

identical at the amino acid level and are known to have similar biochemical activities and to functionally complement each other (10, 15).

Rotaviruses are the leading etiologic agent of severe diarrheal disease in infants and young children, causing an estimated 600,000 deaths each year, mostly in developing countries (24). These viruses have a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. During or shortly after cell entry, the infecting virus uncoats, losing the two proteins of the outer layer and yielding a double-layered particle that is transcriptionally active. The viral mRNAs contain a 5'-methylated cap structure but lack the poly(A) tail characteristic of most cellular mRNAs. Instead, rotavirus mRNAs have a consensus sequence (UGACC) at their 3' end that is conserved in all segments of the viral genome (27). The rotavirus nonstructural protein NSP3 has been shown to bind to this consensus sequence through its amino-terminal domain. NSP3 also binds eIF4GI through its carboxy-terminal domain, in the same region used by PABP but with higher affinity; thus, it has been proposed that during rotavirus infection NSP3 evicts PABP from eIF4GI, impairing the translation of cellular mRNAs while enhancing at the same time the translation of rotaviral mRNAs (26, 27).

The expression of rotavirus genes can be efficiently and specifically silenced by RNA interference (RNAi) using small interfering RNAs (siRNAs) (1). This has proven to be a very useful tool to dissect the function of rotaviral genes in the context of virus-infected cells (1, 3, 4, 18, 19, 31). In this work we have silenced the expression of NSP3 to characterize the role of this protein in the replication cycle of the virus. We found that in the absence of NSP3 the cellular protein synthe-

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. Phone: (52) (777) 3291615. Fax: (52) (777) 3172388. E-mail: susana@ibt.unam.mx.

sis was not inhibited, supporting previous observations (26, 27). However, the synthesis of viral proteins was unexpectedly not affected, and even more, the yield of viral progeny increased, which correlated with an increased synthesis of dsRNA. The lack of relevance of the NSP3-eIF4GI interaction for the translation of viral transcripts was supported by the fact that silencing the expression of eIF4GI did not affect the synthesis of viral proteins. Altogether, these results indicate that NSP3 is not required for translation of viral mRNAs, as is widely accepted (2, 6, 30), and suggest that the two domains of NSP3 (eIF4GI and RNA binding) might have independent functions.

MATERIALS AND METHODS

Cells, viruses, and antibodies. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 2% fetal bovine serum and was used for all experiments carried out in this work. Rhesus rotavirus (RRV) was obtained from H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA, and was propagated in MA104 cells as described previously (23). The rabbit hyperimmune serum to NSP3 and the monoclonal antibody (MAb) HS2 directed to VP4 have been described previously (9). Polyclonal antibodies to purified RRV triple-layered particles (TLPs) and to recombinant vimentin protein were produced in rabbits as described previously (18). The antibody to eIF4GI was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); goat anti-firefly luciferase antibody was obtained from Chemicon (Temecula, CA). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA), and horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Calif.); goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) coupled to Alexa 568 and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa 488 were from Molecular Probes (Eugene, OR).

siRNA transfection. siRNA^{NSP3} had the sequence AAUUGGAUGACUGA CUCUCGA (sense) and UCGAGAGUCAGUCAUCCAAUU (antisense), corresponding to nucleotides 281 to 301 of the RRV NSP3 gene (accession number AY065842). siRNA^{eIF4GI} had the sequence AAUUGGCUGAGGACAUG GAAA (sense) and UUUCCAUGUCUCAGCCAAUU (antisense), corresponding to nucleotides 4245 to 4265 from the human eIF4GI gene (GenBank accession number NM_182917). As an irrelevant control, a previously reported siRNA to the green fluorescent protein (siRNA^{IRRR}) (18) was used. The siRNAs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Transfection of siRNAs was carried out in nearly confluent cell monolayers using Lipofectamine (Invitrogen), as described previously (18). The transfection mixture was added to cells previously washed with MEM and incubated for 8 h at 37°C. After this time the transfection mixture was removed, and the cells were washed with MEM and kept in this medium for 48 h at 37°C before virus infection.

Infection of cells and titration of viral progeny. Transfected cell monolayers in 24- or 48-well plates were infected with RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 3. After incubation for the indicated periods of time at 37°C, the cells were lysed by two freeze-thaw cycles, and the lysates were treated with 10 µg/ml of trypsin for 30 min at 37°C to activate the virus infectivity before titration. The virus infectious titer was obtained by an immunoperoxidase focus assay (13, 23).

Immunoassays. Immunofluorescence was essentially carried out as previously described (4, 29), using a rabbit polyclonal antibody to NSP3 and MAb HS2 directed to VP4. The slides were analyzed with a Nikon E600 epifluorescence microscope coupled to a DXM1200 digital still camera (Nikon). Immunoblot assays were performed as described above, using antibodies to NSP3, luciferase, RRV TLPs, vimentin, or eIF4GI.

Radiolabeling of proteins. Cells grown in 48-well plates were transfected with siRNAs and infected with RRV as described above. At the indicated times the medium was replaced by MEM without methionine, supplemented with 40 µCi/ml of Easy-tag Express-³⁵S labeling mix (Dupont, NEN) and incubated for different periods of time as indicated. The cells were then lysed with Laemmli sample buffer. The samples were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), adjusting the amount of protein loaded in each lane by Coomassie blue staining.

Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR). The level of gene 10 RNA(+), which includes both mRNA and the positive-strand RNA present in gene 10 dsRNA, was quantified by real-time PCR as described previously (19). The level of gene 10 RNA(-) was determined by initially priming the reverse transcriptase reaction with the reverse primer 5'-GAGCAATCTTCATGGTTG GAA-3' (nucleotides 173 to 193 of RRV gene 10), which is complementary to

the negative strand of gene 10. The amount of mRNA was calculated from subtracting the amount of RNA(-) (present only in, and thus equivalent to, dsRNA) from the total amount of RNA(+) obtained.

Luciferase expression. Plasmids pTet-off, which expresses the tetracycline-controlled transactivator, and pTRE2-luc, which expresses firefly luciferase under the control of the transactivator (Clontech), were cotransfected at a ratio of 1:1 using Lipofectamine (Invitrogen). Usually, siRNA-transfected cells were infected 48 h posttransfection, and at 1 h postinfection (hpi) the cells were cotransfected with plasmids pTet-off and pTRE2-luc. At 12 hpi cells were lysed and luciferase activity was determined using the luciferase reporter gene assay kit (Roche), according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

NSP3 is not required for the synthesis of viral proteins. To study the role of the viral nonstructural protein NSP3 in rotavirus-infected cells, the expression of this protein was silenced by RNAi. For this, a chemically synthesized siRNA that targets RRV gene 8 was tested for its effect on the synthesis of NSP3 and on total viral protein synthesis. MA104 cells were transfected with siRNAs to either NSP3 (siRNA^{NSP3}), to the green fluorescent protein as an irrelevant sequence (siRNA^{IRRR}), or to VP4 (siRNA^{VP4}) as a positive control (4). Forty-eight hours posttransfection the cells were infected with RRV and were either metabolically labeled for 8 h at 4 hpi or fixed and immunostained at 8 hpi. By immunofluorescence only about 20% of the infected cells transfected with siRNA^{NSP3} were positive to an anti-NSP3 antibody, compared to infected control cells transfected with the irrelevant siRNA, in all of which NSP3 could be clearly detected (Fig. 1A). Accordingly, by SDS-PAGE and autoradiography, the synthesis of NSP3 was found to be severely decreased in cells transfected with siRNA^{NSP3}, compared to cells transfected with siRNA^{VP4} or siRNA^{IRRR} (Fig. 1B). This observation was confirmed by Western blot analysis of NSP3 (Fig. 1C). A densitometric analysis of NSP3 and NSP2 in the autoradiogram and of NSP3 and vimentin (which was used as a loading control) in the Western blot showed that at 12 hpi the relative amount of NSP3 with respect to vimentin (percentage) in cells transfected with the control siRNA or with siRNA^{NSP3} was 73% and 6%, respectively (Fig. 1C), indicating that the amount of NSP3 that accumulates in the presence of siRNA^{NSP3} is about 10 times lower than that accumulated in cells treated with the irrelevant siRNA. The amount of NSP3 relative to NSP2 was also calculated in the autoradiogram, where it was found that NSP3 represented about 16% of NSP2 in the control-transfected cells, while this number dropped to 2.8% in the cells where NSP3 was silenced, indicating that the amount of NSP3 under these conditions decreased about six times (Fig. 1B). These results indicate that siRNA^{NSP3} specifically and effectively silenced the expression of the RRV NSP3 gene. Surprisingly, given the central role proposed for NSP3 during translation of rotaviral mRNAs (26, 27), the level of all other viral proteins remained largely unaffected (Fig. 1B). On the other hand, the background of cellular proteins appeared more intense when NSP3 was silenced than when no siRNA or the siRNA^{IRRR} was used, indicating that in the absence of NSP3 the shutoff of cellular proteins observed in rotavirus-infected cells is less pronounced, as previously suggested (26, 27).

To determine if NSP3 was required for the synthesis of viral proteins at some point during the infection cycle, infected cells transfected with siRNA^{NSP3} or the irrelevant siRNA were met-

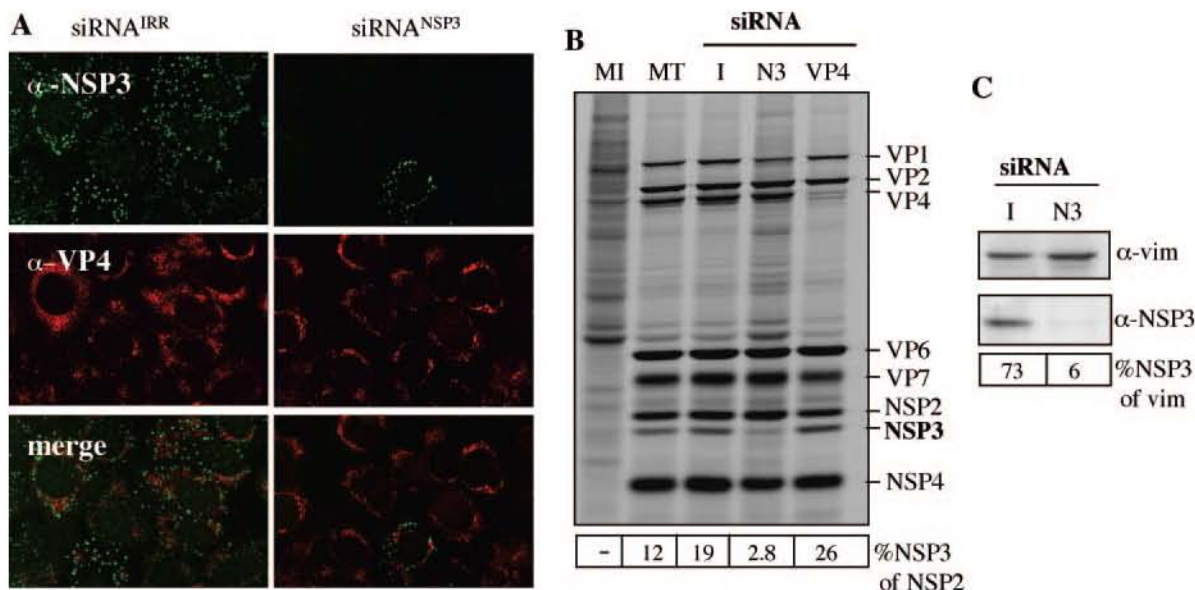


FIG. 1. NSP3 is not required for the synthesis of viral proteins. MA104 cells were transfected with the indicated siRNA to either NSP3 (N3), VP4, or an irrelevant (I) sequence and infected with RRV at an MOI of 3, as described in Materials and Methods. (A) At 8 hpi the cells were fixed and immunostained with a rabbit polyclonal antibody to NSP3 and MAbs HS2 to VP4 as primary antibodies, as indicated, followed by incubation with goat anti-mouse IgG coupled to Alexa 568 and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa 488 as secondary antibodies. (B) At 4 hpi the cells were metabolically labeled with 40 μ Ci/ml of Easy-tag Express- 35 S for 8 h and then lysed in Laemmli sample buffer. The labeled proteins were resolved by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography. MT, mock-transfected cells, infected with RRV; MI, mock-infected cells. The position of the viral proteins is indicated. (C) Immunoblot analysis of RRV NSP3. The transferred proteins were incubated with hyperimmune sera to NSP3 and vimentin (vim) as indicated, and the bound antibodies were detected by incubation with a peroxidase-labeled anti-rabbit immunoglobulin antibody. The amount of loaded protein was previously adjusted by visual inspection of Coomassie blue-stained gels. A densitometric analysis of NSP3 and NSP2 in the autoradiogram and of NSP3 and vimentin (which was used as a loading control) in the Western blot was performed. The numbers below the gels represent the relative amount (percentage) of NSP3 with respect to NSP2 or vimentin.

abolically labeled for 1 h at different times postinfection, and the pattern of viral proteins was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 2A); the presence of NSP3 at each time point was also detected by Western blotting (Fig. 2B). At all times evaluated (from 2 to 8 hpi), the synthesis of all viral proteins, with the exception of NSP3, was found to be very similar in cells transfected with either siRNA^{NSP3} or siRNA^{IRR}, suggesting that the synthesis of viral proteins is independent of NSP3 throughout the entire virus replication cycle. In general, the relative amount of NSP3 with respect to NSP2 ranged from 25 to 42% throughout the different time points in control-transfected cells, while in the cells where NSP3 was knocked down, it decreased to 5 to 13%, NSP2 being taken as 100% (Fig. 2A).

NSP3 is required to shut off the synthesis of cellular proteins. To investigate whether the synthesis of cellular proteins in rotavirus-infected cells was indeed less inhibited in the absence of NSP3, the activity of a reporter protein was determined. Cells were transfected with the different siRNAs, and 48 h posttransfection the cells were infected with rotavirus and cotransfected with plasmids pTet-off and pTRE2-luc to direct the synthesis of luciferase (see Materials and Methods). At 12 hpi the level of the reporter protein was assayed both by activity and by Western blotting (Fig. 3A). The levels of expression of luciferase were not significantly modified in mock-infected cells transfected with the different siRNAs. In contrast, luciferase was not detected when the cells were in-

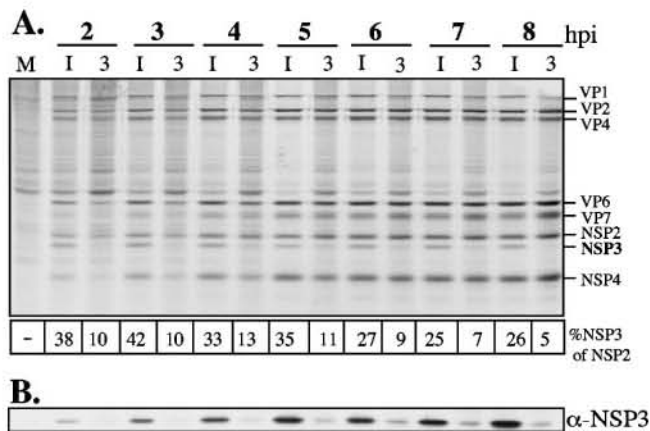


FIG. 2. Viral protein synthesis is independent of NSP3 throughout the virus replication cycle. MA104 cells in 48-well plates were transfected with either an irrelevant siRNA (I) or siRNA^{NSP3} (N3) and were infected with RRV. (A) At 30 min before the indicated times postinfection (hours) the cells were pulse-labeled for 30 min with Easy-tag Express- 35 S. The cells were then lysed in Laemmli sample buffer and the proteins separated by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography. (B) Immunoblot analysis of RRV NSP3, carried out as described in the legend for Fig. 1. The amount of loaded protein was previously adjusted by visual inspection of Coomassie blue-stained gels. A densitometric analysis of NSP3 and NSP2 in the autoradiogram was performed. The numbers below the gel in panel A represent the relative amount (percentage) of NSP3 with respect to NSP2. Lane M, mock-infected cells.

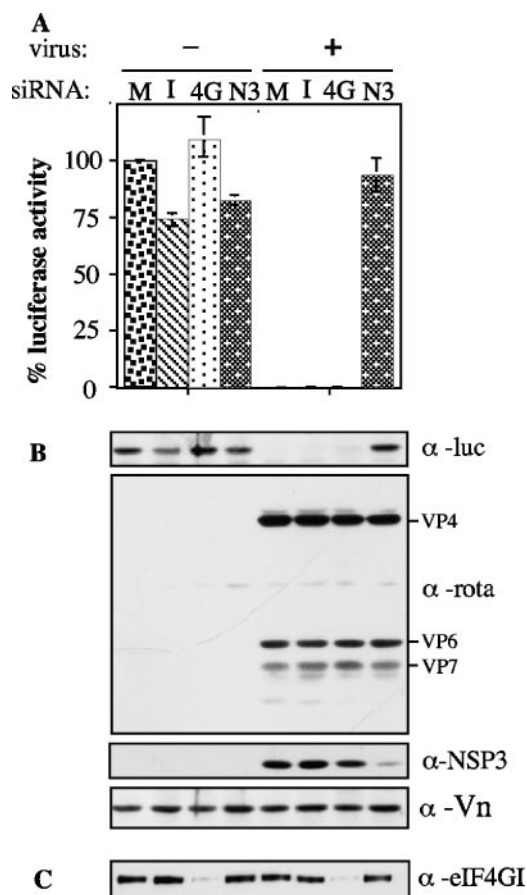


FIG. 3. Silencing the expression of NSP3 prevents the shutoff of cellular proteins. (A) MA104 cells in 24-well plates were transfected with the indicated siRNAs to either NSP3 (N3), eIF4GI (4G), or an irrelevant sequence (I); 48 h posttransfection the cells were either infected (+) or mock infected (-) with RRV and then cotransfected with plasmids pTRE2-luc and pTet-off. At 12 hpi the cells were lysed and the luciferase activity was determined as indicated in Materials and Methods. The data are expressed as percentages of the luciferase activity present in noninfected cells that were mock transfected. (B) Immunoblot analysis (SDS-10% PAGE) of the same samples shown in panel A; the same membrane was probed with antibodies to either luciferase (α -luc), RRV TLPs (α -rota), NSP3 (α -NSP3), or vimentin (α -Vn). The viral proteins VP4, VP6, and VP7 are indicated. (C) Immunoblot analysis (SDS-7% PAGE) of the same samples shown in panel A, probed with an antibody to eIF4GI.

ected with rotavirus, with the exception of those cells in which the expression of NSP3 was knocked down; in that case the level of the reporter protein was comparable to those found in noninfected cells both by Western blotting and by the activity assay (Fig. 3A). The synthesis of NSP3, as well as that of the viral structural proteins, was also monitored by Western blotting in these same experiments. As described above for metabolically labeled proteins (Fig. 1B), the amount of viral structural proteins synthesized did not depend on the presence of NSP3 (Fig. 3B). The complete inhibition of the translation of the luciferase mRNA, which is capped and polyadenylated, in virus-infected cells and its restoration by silencing the expression of NSP3 strongly support the role of this protein in shutting off the translation of cellular mRNAs. The all-or-nothing

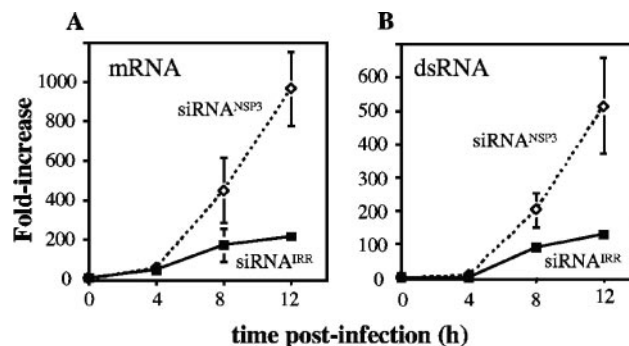


FIG. 4. The synthesis of the viral mRNA and dsRNA is increased in NSP3-silenced cells. Cells transfected with either an irrelevant siRNA^{IRR} or siRNA^{NSP3} were infected with RRV, and at the indicated times total RNA was extracted with Trizol, and the levels of gene 10 RNA(+) and RNA(-) strands were determined by real-time RT-PCR. The results are expressed as an increase (*n*-fold) over the levels detected at time zero infection (immediately after the end of the virus adsorption period). The amount of mRNA shown in panel A was calculated from subtracting the amount of RNA(-) (present only in, and thus equivalent to, dsRNA), shown in panel B, from the total amount of RNA(+) obtained. The arithmetic mean \pm standard deviation of two independent experiments, performed in triplicate, is shown.

synthesis effect observed for the luciferase in the above-described conditions, compared to the observation that the cell protein synthesis was not completely restored when NSP3 was knocked down, might be due to the fact that the luciferase reporter system used in these assays involves the translation of two proteins, including the activator protein from the pTet-off plasmid, as well as the translation of the luciferase mRNA, which might result in an exacerbated inhibition and restoration of luciferase translation.

RNA synthesis is increased in the absence of NSP3. To evaluate if the level of viral RNA was affected in the absence of NSP3, the relative amounts of viral mRNA and dsRNA produced in cells transfected with either siRNA^{NSP3} or siRNA^{IRR} were determined by semiquantitative RT-PCR. The accumulation at different times postinfection of gene 10-positive (RNA⁺) and -negative (RNA⁻) RNA strands was used to estimate the presence of viral mRNA and dsRNA, respectively. Gene 10 was selected as a marker for the general synthesis of viral RNA, since the quantitative RT-PCR conditions for its determination were already set up in the laboratory (C. Ayala-Breton et al., unpublished data). The relative amounts of both viral mRNA (Fig. 4A) and genomic dsRNA (Fig. 4B) were increased in cells transfected with siRNA^{NSP3} compared to cells transfected with the irrelevant siRNA. At 12 hpi there was about four times more viral mRNA and approximately three times more dsRNA in cells transfected with siRNA^{NSP3}, suggesting an enhanced replication of viral RNA in the absence of NSP3.

The yield of viral progeny is increased in the absence or with reduced amounts of NSP3. To determine if the enhanced replication of viral RNA observed in NSP3-silenced cells results in an increase in the production of infectious viral progeny, cells transfected with either siRNA^{NSP3} or siRNA^{IRR} were infected with RRV, and 12 hpi the cells were harvested and the titer of the virus present in the cell lysates was determined by an

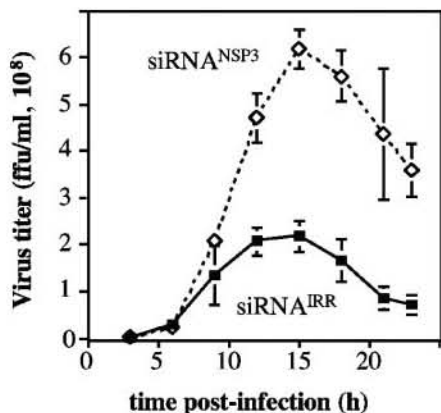


FIG. 5. The yield of progeny virus increases when NSP3 is silenced. MA104 cells in 48-well plates were transfected with siRNA^{NSP3} or with the siRNA^{IRR}, and 48 h posttransfection the cells were infected with RRV at an MOI of 3. The cells were harvested at the indicated times postinfection, and the progeny virus produced was determined by an immunoperoxidase assay, as described in Materials and Methods. Virus titer is expressed as the number of focus-forming units per ml. Data shown represent the arithmetic means ± standard deviations of two independent experiments.

immunoperoxidase focus-forming unit assay (23). In the absence of NSP3 the virus yield was consistently found to be 2 to 2.5 times higher than that obtained in control-transfected cells (not shown). The production of increased levels of infectious viral progeny in NSP3-silenced cells was also clearly observed in one-step growth curve experiments (Fig. 5). At 9 hpi there was already a difference in the amount of infectious virus particles produced, and at 15 hpi the infectious virus recovered from cells transfected with siRNA^{NSP3} was three times as much as that obtained from control-transfected cells.

The cytopathic effect caused by rotavirus is delayed when NSP3 is knocked down. During the course of the experiments carried out in this work, it was observed that the cell mono-

layers were less damaged when the cells were transfected with the siRNA^{NSP3} than when they were transfected with an siRNA^{IRR}. To further characterize this observation, MA104 monolayers transfected with either siRNA^{NSP3} or siRNA^{IRR} were infected with RRV and at various times postinfection the cytopathic effect was assessed by contrast microscopy and by measuring the release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). While the infected cell monolayer transfected with the siRNA control showed evident damage at 12 hpi, the cell monolayer in which NSP3 was knocked down appeared healthy, with few cells detached (Fig. 6A). This effect was more pronounced at 24 hpi, when the control-transfected cell monolayer was already destroyed, while the cytopathic effect was barely noticeable in the monolayer transfected with siRNA^{NSP3} (Fig. 6A). Similarly, there was about 50% less LDH activity released into the culture medium from the infected cells transfected with siRNA^{NSP3} compared to siRNA^{IRR}-transfected cells (Fig. 6B). These results indicate that in the absence, or in the presence of low levels, of NSP3, the cytopathic effect caused by rotavirus infection is less pronounced, which could explain the increased production of viral progeny in NSP3-silenced cells. Also, these results suggest that the inhibition of cell protein synthesis caused by NSP3 might result in the loss of cell viability.

The synthesis of viral proteins is independent of eIF4GI. It has been shown that NSP3 interacts directly with the initiation translation factor eIF4GI, and it has been proposed that this interaction is needed to ensure the efficient translation of the viral mRNAs (12, 26, 27). Since in the absence or with reduced levels of NSP3 the synthesis of viral proteins was not affected, we investigated whether eIF4GI was nonetheless important for translation of viral mRNAs. For this, the expression of eIF4GI was silenced with a specific siRNA (siRNA^{eIF4GI}). This siRNA was effective in blocking the expression of the target gene, since 48 h after transfection the level of eIF4GI, as detected by Western blot analysis, was decreased by about 90% compared to cells transfected with either siRNA^{IRR} or siRNA^{NSP3}

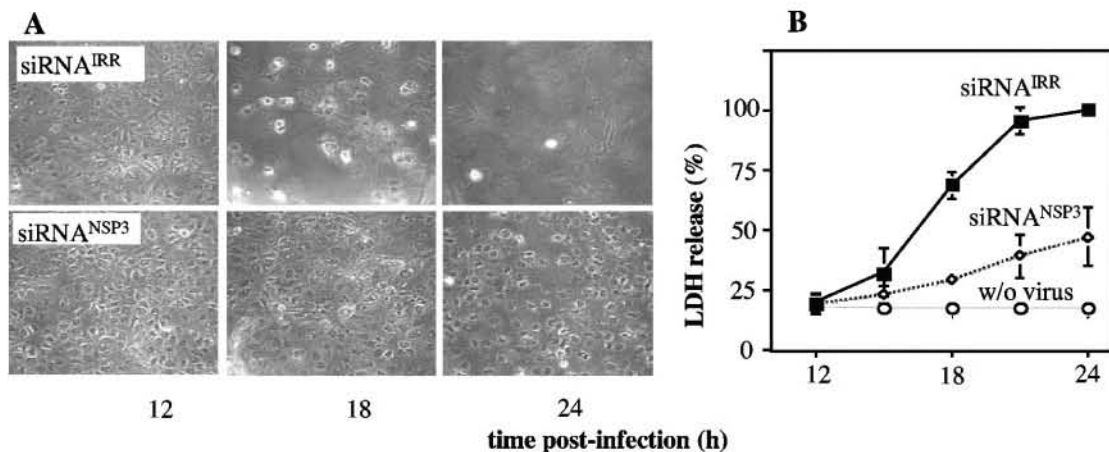


FIG. 6. The cytopathic effect caused by rotavirus is delayed when NSP3 is knocked down. MA104 cells in 48-well plates were transfected with siRNA^{NSP3} or siRNA^{IRR}, and 48 h posttransfection the cells were infected or not with RRV at an MOI of 3. The cells were harvested at the indicated times postinfection and photographed using phase-contrast microscopy (A), and the activity of lactate dehydrogenase was determined in the cell culture medium at each time point (B), using a commercial kit (Sigma) following the manufacturer's instructions. The LDH activity is expressed as a percentage of the activity released at 24 hpi, which was taken as 100%. "w/o virus" indicates the LDH activity released by mock-infected cells. Data shown represent the arithmetic means ± standard deviations of two independent experiments.

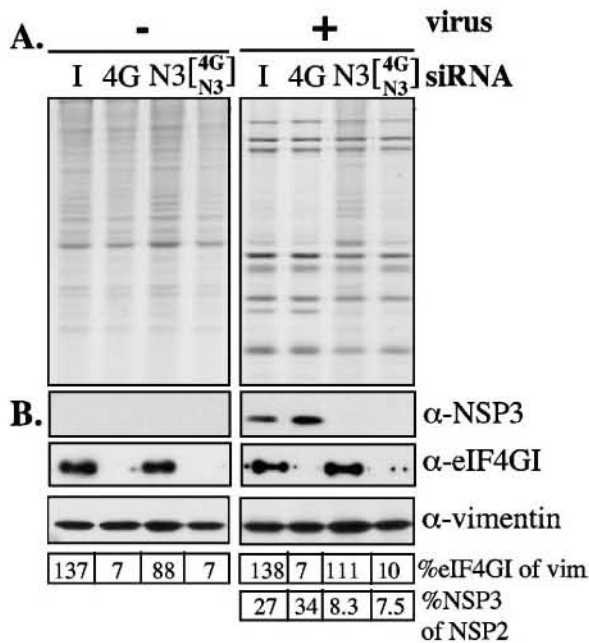


FIG. 7. Synthesis of cellular and viral proteins in eIF4GI-silenced cells. (A) MA104 cells in 48-well plates were transfected with an irrelevant siRNA (I), siRNA^{eIF4GI} (4G), siRNA^{NSP3} (N3), or a mixture of both 4G and NSP3, and 48 h posttransfection the cells were infected (+) or not (-) with RRV. At 4 hpi the cells were labeled with 40 μ Ci/ml of Easy-tag Express-³⁵S for 8 h. The cells were then lysed in Laemmli sample buffer and the proteins separated by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography. (B) Immunoblot analysis of NSP3 (in SDS-10% PAGE), eIF4GI protein (in SDS-7% PAGE), or vimentin synthesized in cells transfected with the indicated siRNAs. The transferred proteins were incubated with antibodies to NSP3, eIF4GI, and vimentin, and the bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled anti-rabbit immunoglobulin antibody. The amount of loaded protein was previously adjusted by visual inspection of Coomassie blue-stained gels. A densitometric analysis of NSP3 and NSP2 in the autoradiogram and of eIF4GI and vimentin (which was used as an internal control) in the Western blots was performed. The numbers below the gels represent the relative amount (percentage) of eIF4GI with respect to vimentin or the relative amount of NSP3 with respect to NSP2, as indicated.

(Fig. 7B). In the absence or with reduced levels of eIF4GI, a slight decrease in the synthesis of cellular proteins was detected by SDS-PAGE and autoradiography of ³⁵S-labeled proteins (Fig. 7A). This decrease corresponded to 20 to 25% of total protein synthesis, as determined by incorporation of ³⁵S-labeled amino acids into trichloroacetic acid-precipitable material. The same level of reduction in the incorporation of ³⁵S was observed in infected as well as noninfected cells. The effect of silencing the expression of eIF4GI on the synthesis of luciferase was also characterized. The synthesis of the reporter protein, as determined both by activity and by Western blotting, was not significantly altered in cells where the levels of eIF4GI had been markedly reduced by siRNA^{eIF4GI} (Fig. 3A and B); the knockdown of eIF4GI in this assay was verified by Western blotting (Fig. 3C). Of note, when the siRNA^{eIF4GI}-transfected cells were infected with rotavirus 48 h posttransfection, the synthesis of viral proteins was not significantly altered at 12 hpi, compared to control cells transfected with either siRNA^{IRR} or siRNA^{NSP3} (Fig. 3A). Furthermore, the

yield of infectious viral progeny was also unaffected in eIF4GI-silenced cells (119% \pm 18.6% of infectious virus produced, where 100% is the amount of virus obtained from cells transfected with siRNA^{IRR}). Altogether, these results suggest that while the overall protein synthesis of MA104 cells is very little affected by silencing the expression of eIF4GI, the synthesis of the rotavirus proteins does not depend on the presence of this translation factor.

The effect of knocking down eIF4GI and NSP3 at the same time was also studied. Cells were transfected with a mixture of siRNA^{eIF4GI} and siRNA^{NSP3} and then infected with rotavirus 48 h posttransfection. By Western blotting the level of NSP3 with respect to NSP2 decreased about fourfold when silenced alone or in combination with eIF4GI (Fig. 7A and B); similarly the level of eIF4GI was reduced about 15 times compared to vimentin. Interestingly, when both proteins were silenced, the viral protein synthesis was not significantly affected while the cellular protein synthesis decreased compared to the profile obtained when NSP3 was silenced alone, suggesting that the cellular protein synthesis that takes place when NSP3 is silenced depends on eIF4GI. Silencing both proteins resulted in a cellular protein pattern similar to that observed when both proteins were present, i.e., the pattern observed in a regular infection, confirming that NSP3 prevents the synthesis of cellular proteins by interacting with eIF4GI.

DISCUSSION

The role of NSP3 as a substitute factor for PABP for translation of rotaviral mRNAs has been widely used and accepted as an argument to support the relevance of circularization during translation of cellular mRNAs (2, 6, 30). The experimental evidence that supports the model that proposes that NSP3 is responsible for shutting off cellular protein synthesis, while ensuring at the same time the translation of viral mRNAs, has been generated by experiments in vitro or by expression of the NSP3 gene in uninfected cells. These observations include the following: (i) the N-terminal domain of NSP3 binds with high affinity and specificity to the 3'-end consensus sequence of rotaviral mRNAs (5, 26, 27, 34); (ii) the carboxy-terminal domain of NSP3 binds eIF4GI with high affinity (12, 25, 26), evicting PABP from its interaction with this translation factor (26); (iii) swine testicular cells stably transfected to express NSP3 showed a reduced protein synthesis of capped and polyadenylated RNAs up to onefold in vivo, and in an in vitro system the synthesis of polyadenylated RNAs was inhibited up to 10-fold (34); (iv) the expression of NSP3 from a recombinant vaccinia virus decreased the level of cellular protein synthesis, and this inhibition was correlated with the concentration of NSP3 produced in the cell (22).

Even though the interactions of NSP3 with eIF4GI and the 3' end of viral mRNAs have been clearly established, there is no direct evidence that NSP3 engages simultaneously in these two interactions to promote the circularization of viral mRNAs, and although it is generally accepted, there is also no evidence that these interactions favor the translation of viral mRNAs. Using an in vitro system, Vende et al. (34) observed that a recombinant NSP3 protein enhanced the translation of a reporter gene containing the 3' untranslated region of rotaviral genes; however, in their system the recombinant protein also

stimulated the translation of a poly(A)-containing reporter. Furthermore, an NSP3 mutant in which the eIF4GI binding domain was deleted failed to stimulate the translation of the reporter mRNA containing the rotaviral 3' untranslated region, but it also seemed to inhibit the translation of a reporter containing a poly(A) tail at its 3' end; unfortunately these results were not discussed. In this work we found that the synthesis of viral proteins was not affected by knocking down the expression of NSP3, suggesting that binding of this protein to the 3' end of the viral mRNAs is not necessary for their translation. It is not possible to rule out the possibility that very little NSP3 (not detectable in our assays) might be sufficient to allow the synthesis of viral proteins. However, this observation is supported by the fact that in the earlier experiments performed by Piron et al. (26), the viral protein synthesis was already apparent at 2 hpi, and NSP3 was not detected in association with eIF4GI until 3.5 to 4 hpi, suggesting that the interaction of NSP3 with eIF4GI is not necessary for viral translation. Furthermore, an increased level of viral RNA synthesis (both single stranded and double stranded) was detected in cells where NSP3 was silenced, suggesting that rather than promoting the translation of viral mRNAs, the interaction of NSP3 with the 3' end of viral mRNAs might prevent them from being selected for replication, thus ensuring a pool of viral transcripts available for translation. Alternatively, the binding of NSP3 to the viral mRNAs might protect them from degradation. If this was the case, the fact that we did not find a decrease in the amount of mRNA when NSP3 was silenced could be explained by the increased viral RNA replication observed under these conditions, associated with an enhanced secondary transcription that could compensate for the putative lower stability of the viral mRNAs in the absence of NSP3. Interestingly, when the structural and biophysical characteristics of the NSP3-RNA complex were determined, it was found that the N-terminal domain of NSP3 had high-affinity RNA binding (K_d , 79 nM) and low dissociation (half-life of 8 h) rates. Based on these observations Deo et al. (5) suggested that the binding of NSP3 to the viral RNA might even interfere with rotavirus genome replication.

The fact that in NSP3-silenced cells the virus yield, as well as the amount of viral single-stranded RNA and dsRNA, was increased indicates that NSP3 is not required for the replication of the virus in cell culture (MA104, CV1, A549, and MDCK cells were tested, with the same results [not shown]). However, this protein might still be relevant in an *in vivo* infection, where either protection of viral mRNAs from degradation, rescuing mRNA from entering the replication pathway, or even helping mRNAs to be translated might be required. Further experiments are required to evaluate these possibilities.

To further demonstrate that the interaction of NSP3 with eIF4GI is not essential for the translation of viral proteins, we silenced the expression of this translation factor. In agreement with our previous results we found that the synthesis of viral proteins, as well as the production of viral progeny, was not modified when this factor was silenced, while the synthesis of cellular proteins was reduced by about 25%. Even though the reduction of the total protein synthesis seems low in view of the central role that eIF4GI plays in translation, similar findings were reported when this factor was cleaved by the 2Apro

protease of several picornaviruses, which preferentially cleave the factor early after cell infection (11, 32); thus, protein synthesis decreased by 35% in *Xenopus laevis* oocytes injected with 2Apro from coxsackievirus B4, even though eIF4GI was completely cleaved (17). These results have been explained by the fact that eIF4GII can functionally complement eIF4GI (10, 15); thus, the small reduction of total protein synthesis observed in this work when the expression of eIF4GI was silenced could result from complementation of eIF4GII under these conditions. The fact that in standard rotavirus-infected cells (where NSP3 is expressed at normal levels) a more severe shutdown of cellular protein synthesis is observed, compared to noninfected cells in which eIF4GI was silenced, suggests that NSP3 binds to both eIF4GI and eIF4GII. Indeed, the region of eIF4GI that interacts with NSP3 is very similar, if not identical, in eIF4GII (12); thus, although not formally proven, it might be expected that NSP3 could bind both factors, displacing PABP from both eIF4GI and eIF4GII, resulting in the severe shutoff of cell protein synthesis induced by rotavirus. It cannot be ruled out, however, that rotaviruses might use more than one mechanism to control the translation machinery of the cell. Silencing other rotavirus proteins, and assessing their effect on cellular protein synthesis, will show if this is the case.

Altogether, the data obtained in this work suggest that the eIF4G and RNA binding domains of NSP3 function independently. The eIF4G binding domain seems to be responsible, at least partially, for the shutoff of cell protein synthesis, as has been previously suggested (26), by competing off the binding of PABP needed for the translation of many cellular mRNAs (16). The relative abundance of viral capped mRNAs in an infected cell and the inability of PABP-bound polyadenylated mRNAs to bind to eIF4G (sequestered by NSP3) might explain the successful and efficient translation of the viral mRNAs. On the other hand, the RNA binding domain of NSP3 might function to protect the viral mRNAs from degradation and/or to keep a pool of viral mRNAs in the cytosol, available for translation. This latter function could be achieved either by preventing the binding of the viral RNA polymerase VP1 to the 3' ends of mRNAs or by taking out recently synthesized mRNAs from viroplasm, their site of synthesis (31), to ensure their availability for translation.

Viruses have evolved different strategies to shut down the synthesis of cellular proteins in order to ensure the translation of their own proteins, avoiding competition with cellular mRNAs (reviewed in references 2 and 30). If NSP3 is not needed for translation of viral mRNAs, and in NSP3-silenced cells the protein synthesis machinery can efficiently translate both cellular and viral mRNAs without any apparent detriment in the synthesis of viral proteins, why have rotaviruses evolved such a sophisticated method for shutting off cell protein synthesis? One possibility could be that the virus needs to shut off the synthesis of a particular set of cellular proteins that could interfere with the replication cycle and/or propagation of the virus *in vivo*. The inhibition of protein synthesis could also be required to impair the structural integrity of the cell, facilitating cell lysis and the release of progeny viruses, as has been reported for adenoviruses; in this case, when the shutoff of protein synthesis was inhibited in adenovirus-infected cells, the yield of viral progeny was not affected, while the adenovirus-mediated cytopathic effect was decreased (35). This would

seem to be the case for rotaviruses, since in NSP3-silenced cells the characteristic rotavirus-induced cytopathic effect is delayed. Interestingly, Mossel and Ramig found that the gene that codes for NSP3 is responsible for the extraintestinal spread of rotavirus in mice (21). It would be interesting to determine the identity of the cellular protein(s) whose absence results in the lysis of rotavirus-infected cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rafaela Espinosa for her excellent technical assistance with cell culture.

This work was partially supported by grants 55003662 and 55000613 from the Howard Hughes Medical Institute and G37621N from the National Council for Science and Technology-Mexico. H.M. is a recipient of a scholarship from DGEP/UNAM.

REFERENCES

- Arias, C. F., M. A. Dector, L. Segovia, T. Lopez, M. Camacho, P. Isa, R. Espinosa, and S. Lopez. 2004. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* **102**:43–51.
- Bushell, M., and P. Sarnow. 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J. Cell Biol.* **158**:395–399.
- Campagna, M., C. Eichwald, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 2005. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* **86**:1481–1487.
- Dector, M. A., P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **3**:1175–1180.
- Deo, R. C., C. M. Groft, K. R. Rajashankar, and S. K. Burley. 2002. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* **108**:71–81.
- Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello, and A. M. Skalka. 2004. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, 2nd ed., p. 378–410. ASM Press, Washington, D.C.
- Gebauer, F., and M. W. Hentze. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:827–835.
- Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:913–963.
- Gonzalez, R. A., R. Espinosa, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* **145**:1963–1973.
- Gradi, A., H. Imataka, Y. V. Svitkin, E. Rom, B. Raught, S. Morino, and N. Sonenberg. 1998. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* **18**:334–342.
- Gradi, A., Y. V. Svitkin, H. Imataka, and N. Sonenberg. 1998. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:11089–11094.
- Groft, C. M., and S. K. Burley. 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* **9**:1273–1283.
- Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362–9371.
- Hershey, J. W. B., and W. C. Merrick. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, p. 33–88. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Imataka, H., A. Gradi, and N. Sonenberg. 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.
- Kahvejian, A., Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou, and N. Sonenberg. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**:104–113.
- Keiper, B. D., and R. E. Rhoads. 1997. Cap-independent translation initiation in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **25**:395–402.
- Lopez, T., M. Camacho, M. Zayas, R. Najera, R. Sanchez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* **79**:184–192.
- Lopez, T., M. Rojas, C. Ayala-Breton, S. Lopez, and C. F. Arias. 2005. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J. Gen. Virol.* **86**:1609–1617.
- Michel, Y. M., D. Poncet, M. Piron, K. M. Kean, and A. M. Borman. 2000. Cap-poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* **275**:32268–32276.
- Mossel, E. C., and R. F. Ramig. 2002. Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.* **76**:6502–6509.
- Padilla-Noriega, L., O. Paniagua, and S. Guzman-Leon. 2002. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* **298**:1–7.
- Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez. 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200.
- Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:565–572.
- Piron, M., T. Delaunay, J. Grosclaude, and D. Poncet. 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* **73**:5411–5421.
- Piron, M., P. Vende, J. Cohen, and D. Poncet. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**:5811–5821.
- Poncet, D. 2003. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell, p. 185–205. *In* U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Preiss, T., and M. W. Hentze. 1998. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **392**:516–520.
- Sanchez-San Martin, C., T. Lopez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**:2310–2318.
- Schneider, R. J., and I. Mohr. 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* **28**:130–136.
- Silvestri, L. S., Z. F. Taraporewala, and J. T. Patton. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.* **78**:7763–7774.
- Svitkin, Y. V., A. Gradi, H. Imataka, S. Morino, and N. Sonenberg. 1999. Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J. Virol.* **73**:3467–3472.
- Tarun, S. Z., Jr., and A. B. Sachs. 1995. A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* **9**:2997–3007.
- Vende, P., M. Piron, N. Castagne, and D. Poncet. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* **74**:7064–7071.
- Zhang, Y., and R. J. Schneider. 1994. Adenovirus inhibition of cell translation facilitates release of virus particles and enhances degradation of the cyokeratin network. *J. Virol.* **68**:2544–2555.

Conclusiones

1.- Las proteínas NSP3 y eIF4GI son prescindibles en la eficiente síntesis de proteína viral.

2.- La inhibición de la expresión de NSP3 provoca una disminución del efecto citopático durante la infección.

3.- La unión de NSP3 al extremo 3' de los mRNAs virales tiene una finalidad diferente a la de hacer eficiente su traducción.

4.- El factor eIF2 α se encuentra fosforilado durante la infección con rotavirus y este estado es mantenido durante todo el ciclo replicativo, fenotipo en el cual están involucradas, de manera directa o indirecta, las proteínas virales VP2, NSP2 y NSP5.

5.- Durante la infección con rotavirus no se observa formación de gránulos de estrés, posiblemente VP3 podría estar involucrada en esta inhibición..

6.- Algunas proteínas marcadoras de los gránulos de estrés cambian su patrón de distribución en células infectadas.

7.- La salida de TIA al núcleo correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y su localización en el citoplasma es desde tiempos tempranos de la infección.

8.- La relocalización de PABP al núcleo durante la infección es independiente de la inhibición de la síntesis de proteína celular.

Bibliografía

1. Bushell, M. & Sarnow, P. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* **158**, 395-9 (2002).
2. Kedersha, N. & Anderson, P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* **30**, 963-9 (2002).
3. Mamane, Y. et al. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* **23**, 3172-9 (2004).
4. Holland, E. C., Sonenberg, N., Pandolfi, P. P. & Thomas, G. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* **23**, 3138-44 (2004).
5. Mohr, I. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res* **119**, 89-99 (2006).
6. Gale, M., Jr., Tan, S. L. & Katze, M. G. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 239-80 (2000).
7. Kapp, L. D. & Lorsch, J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**, 657-704 (2004).
8. Pestova, T. V. et al. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7029-36 (2001).
9. Preiss, T. & M, W. H. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* **25**, 1201-11 (2003).
10. Sachs, A. B. & Varani, G. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* **7**, 356-61 (2000).
11. Michel, Y. M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K. M. & Borman, A. M. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem* **275**, 32268-76 (2000).
12. Hellen, C. U. & Sarnow, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**, 1593-612 (2001).

13. Sarnow, P. Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J Virol* **77**, 2801-6 (2003).
14. Komar, A. A. & Hatzoglou, M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* **280**, 23425-8 (2005).
15. Jackson, R. J. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* **33**, 1231-41 (2005).
16. Chappell, S. A., Edelman, G. M. & Mauro, V. P. A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1536-41 (2000).
17. Mauro, V. P. & Edelman, G. M. The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12031-6 (2002).
18. Raught, B. & Gingras, A. C. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 43-57 (1999).
19. Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-63 (1999).
20. Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S. & Sonenberg, N. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* **273**, 14002-7 (1998).
21. Gingras, A. C. et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* **15**, 2852-64 (2001).
22. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477-80 (2005).
23. Pyronnet, S., Dostie, J. & Sonenberg, N. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* **15**, 2083-93 (2001).
24. Gray, N. K. & Wickens, M. Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 399-458 (1998).
25. Pestova, T. V. & Hellen, C. U. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* **57**, 651-74 (2000).

26. Dever, T. E. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**, 545-56 (2002).
27. Gradi, A. et al. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* **18**, 334-42 (1998).
28. Byrd, M. P., Zamora, M. & Lloyd, R. E. Generation of multiple isoforms of eukaryotic translation initiation factor 4GI by use of alternate translation initiation codons. *Mol Cell Biol* **22**, 4499-511 (2002).
29. Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N. & Dusanter-Fourt, I. Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol* **24**, 4920-8 (2004).
30. Kimball, S. R. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 25-9 (1999).
31. Novoa, I. et al. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo J* **22**, 1180-7 (2003).
32. Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D. & Hatzoglou, M. Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *J Biol Chem* **277**, 19198-205 (2002).
33. Kim, Y. K. & Jang, S. K. Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 224-31 (2002).
34. Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S. & Harding, H. P. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C273-84 (2003).
35. Proud, C. G. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 3-12 (2005).
36. Wek, R. C., Jiang, H. Y. & Anthony, T. G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**, 7-11 (2006).
37. de Haro, C., Mendez, R. & Santoyo, J. The eIF-2 α kinases and the control of protein synthesis. *Faseb J* **10**, 1378-87 (1996).

38. Berlanga, J. J. et al. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *Embo J* **25**, 1730-40 (2006).
39. Cheng, G., Feng, Z. & He, B. Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. *J Virol* **79**, 1379-88 (2005).
40. Komar, A. A. et al. Novel characteristics of the biological properties of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* eukaryotic initiation factor 2A. *J Biol Chem* **280**, 15601-11 (2005).
41. Clemens, M. J. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 945-9 (1997).
42. Langland, J. O., Cameron, J. M., Heck, M. C., Jancovich, J. K. & Jacobs, B. L. Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus Res* **119**, 100-10 (2006).
43. Garcia, M. A. et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1032-60 (2006).
44. Hengel, H., Koszinowski, U. H. & Conzelmann, K. K. Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* **26**, 396-401 (2005).
45. Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents (2001).
46. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Type I interferons in host defense. *Immunity* **25**, 373-81 (2006).
47. Brush, M. H., Weiser, D. C. & Shenolikar, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **23**, 1292-303 (2003).
48. Kedersha, N. et al. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* **13**, 195-210 (2002).
49. Anderson, P. & Kedersha, N. Stressful initiations. *J Cell Sci* **115**, 3227-34 (2002).
50. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. 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**, 1431-42 (1999).

51. Lopez de Silanes, I. et al. Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* **25**, 9520-31 (2005).
52. Dang, Y. et al. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem* **281**, 32870-8 (2006).
53. Bordeleau, M. E. et al. RNA-Mediated Sequestration of the RNA Helicase eIF4A by Pateamine A Inhibits Translation Initiation. *Chem Biol* **13**, 1287-95 (2006).
54. Mazroui, R. et al. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell* **17**, 4212-9 (2006).
55. Kleijn, M., Vrins, C. L., Voorma, H. O. & Thomas, A. A. Phosphorylation state of the cap-binding protein eIF4E during viral infection. *Virology* **217**, 486-94 (1996).
56. Cuesta, R., Xi, Q. & Schneider, R. J. Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *Embo J* **19**, 3465-74 (2000).
57. Yueh, A. & Schneider, R. J. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* **14**, 414-21 (2000).
58. Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A. & Sonenberg, N. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5578-83 (1996).
59. Vagner, S., Galy, B. & Pyronnet, S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* **2**, 893-8 (2001).
60. Jang, S. K. Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus. *Virus Res* **119**, 2-15 (2006).
61. Connor, J. H. & Lyles, D. S. Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* **76**, 10177-87 (2002).
62. Walsh, D. & Mohr, I. Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev* **18**, 660-72 (2004).

63. Schneider, R. J. & Mohr, I. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* **28**, 130-6 (2003).
64. Ventoso, I., MacMillan, S. E., Hershey, J. W. & Carrasco, L. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS Lett* **435**, 79-83 (1998).
65. Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H. & Sonenberg, N. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11089-94 (1998).
66. Alvarez, E., Menendez-Arias, L. & Carrasco, L. The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* **77**, 12392-400 (2003).
67. Jan, E. & Sarnow, P. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* **324**, 889-902 (2002).
68. McInerney, G. M., Kedersha, N. L., Kaufman, R. J., Anderson, P. & Liljestrom, P. Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol Biol Cell* **16**, 3753-63 (2005).
69. Ventoso, I. et al. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* **20**, 87-100 (2006).
70. Smith, J. A. et al. Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J Virol* **80**, 2019-33 (2006).
71. Robert, F. et al. Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *Mol Biol Cell* **17**, 4632-44 (2006).
72. Otto, G. A., Lukavsky, P. J., Lancaster, A. M., Sarnow, P. & Puglisi, J. D. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *Rna* **8**, 913-23 (2002).
73. Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. & Glass, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* **9**, 565-72 (2003).

74. Estes, M. K., Graham, D. Y., Smith, E. M. & Gerba, C. P. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol* **43**, 403-9 (1979).
75. Nakagomi, O. & Nakagomi, T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch Virol* **120**, 43-55 (1991).
76. Arias, C. & López, S. in *Microbios* (ed. Martínez, J. C.).
77. Chen, D., Barros, M., Spencer, E. & Patton, J. T. Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis. *Virology* **282**, 221-9 (2001).
78. Estes, M. K. & Cohen, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**, 410-49 (1989).
79. Barro, M., Mandiola, P., Chen, D., Patton, J. T. & Spencer, E. Identification of sequences in rotavirus mRNAs important for minus strand synthesis using antisense oligonucleotides. *Virology* **288**, 71-80 (2001).
80. Mitchell, D. B. & Both, G. W. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* **177**, 324-31 (1990).
81. Barro, M. & Patton, J. T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4114-9 (2005).
82. Gonzalez, R. A., Torres-Vega, M. A., Lopez, S. & Arias, C. F. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* **143**, 981-96 (1998).
83. Torres-Vega, M. A. et al. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* **81**, 821-30 (2000).
84. Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzman-Leon, S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* **298**, 1-7 (2002).
85. Poncet, D., Aponte, C. & Cohen, J. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* **67**, 3159-65 (1993).

86. Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *Embo J* **17**, 5811-21 (1998).
87. Patton, J. T. Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Res* **17**, 199-208 (1990).
88. Petrie, B. L., Graham, D. Y., Hanssen, H. & Estes, M. K. Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J Gen Virol* **63**, 457-67 (1982).
89. Petrie, B. L., Greenberg, H. B., Graham, D. Y. & Estes, M. K. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res* **1**, 133-52 (1984).
90. Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol* **78**, 7763-74 (2004).
91. Esparza, J., Gorziglia, M., Gil, F. & Romer, H. Multiplication of human rotavirus in cultured cells: an electron microscopic study. *J Gen Virol* **47**, 461-72 (1980).
92. Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J. & Poncet, D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* **73**, 5411-21 (1999).
93. Groft, C. M. & Burley, S. K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* **9**, 1273-83 (2002).
94. Varani, G. & Allain, F. H. How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nat Struct Biol* **9**, 158-60 (2002).
95. Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**, 7064-71 (2000).
96. Bernstam, L. & Nriagu, J. Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **3**, 293-322 (2000).
97. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**, 1161-208 (2005).
98. Montero, H., Arias, C. F. & Lopez, S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* **80**, 9031-8 (2006).

99. Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S. & Arias, C. F. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol* **86**, 1609-17 (2005).
100. Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules. *J Cell Biol* **172**, 803-8 (2006).
101. Barro, M. & Patton, J. T. Rotavirus NSP1 Inhibits Expression of Type I Interferon by Antagonizing the Function of Interferon Regulatory Factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol* (2007).
102. Hershey, J.W., Mathews, M.B., Sonenberg, N. Translational Control. CSHL. 794 pág. (1996)
103. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, and J. C. Bridger Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves *Lancet*. 2:61-63 (1974)
104. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis *Lancet*:1281-1283 (1973).
105. Cook, S. M., R. I. Glass, C. W. LeBaron, and M.-S. Ho. Global seasonality of rotavirus infections *Bull World Health Organ*. 68:171-177 (1990).
106. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. Rotaviruses, p. 1657-1708. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York (1996).
107. Merrick WC, Hershey JWB. The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis., pp. 31– 69 en Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, eds. 1996. *Translational Control*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab (1996).