



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PAPEL DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN LA
INDUCCIÓN DE ESTRÉS CELULAR**

T E S I S

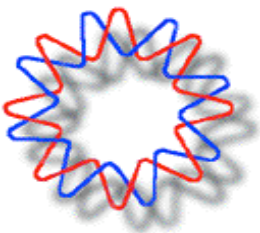
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E T A:

M. C. VICENTA TRUJILLO ALONSO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN.



CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2012



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 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

G R A C I A S

A Dios: por estar siempre conmigo y por permitir que cumpla una mas de mis metas.

A mis padres: por su cariño y comprensión a lo largo de mi vida.

A mis hermanos y sobrinos: por su cariño en todo momento.

A la Dra. Susana López: por su paciencia, enseñanza y apoyo lo largo del postgrado.

Al Dr. Carlos Arias: por su comentarios y sugerencias.

A mi comité tutorial y revisor de tesis: por sus críticas y sugerencias durante la realización del proyecto de investigación y la escritura de la tesis (Drs. Rosa María del Angel, Leonor Pérez, Ramón Gonzalez, Federico Sánchez, Ernesto Ludert, Elena Porta y Ana Lorena Escolano).

A mis compañeros y amigos: por apoyarme en mi trabajo y también por compartir maravillosos momentos.

Este trabajo lo dedico con mucho cariño a mis dos hermanos:
Guillermo Trujillo Alonso† y Maria Cruz Alonso Ramirez†.
Y con un gran amor a mi pequeña **DIANA**.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	6
II. ABSTRACT.....	7
III. INTRODUCCIÓN.....	8
I.1 Papel de PERK en la UPR	11
I.2 Papel de ATF6 en la UPR.....	14
I.3 Papel de IRE1 en la UPR.....	15
I.4 Generalidades de los Rotavirus.....	16
I.5 Ciclo Replicativo de Rotavirus.....	18
I.6 Patogénesis Viral.....	22
I.7 Inducción y modulación de la respuesta de interferón en células infectadas por rotavirus.....	24
IV. ANTECEDENTES.....	28
V. OBJETIVOS.....	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
VII. RESULTADOS.....	39
VIII. DISCUSIÓN.....	63
IX. CONCLUSIONES	68
X. PERSPECTIVAS.....	69
XI. REFERENCIAS.....	69
XII. ANEXOS	80
Anexo 1: Papel de la respuesta a proteína no plegadas en la replicación y patogénesis viral	80
Anexo 2: Resultados publicados	99
Anexo 3: Granulos de estrés en el ciclo de replicación viral.....	112

I. RESUMEN

La respuesta a las proteínas no plegadas o UPR, por sus siglas en inglés “Unfolded Protein Response” se induce cuando proteínas no plegadas o mal plegadas se acumulan en el lumen del Retículo Endoplásmico (RE), condición conocida como estrés del RE. La UPR se ha reportado en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. En el caso de la infección viral, se ha descrito que algunos efectos de la UPR benefician, mientras que otros tienen un efecto deleterio durante la replicación viral. Interesantemente, los virus han desarrollado estrategias para modificar cada uno de los eventos de esta respuesta. Por ello, el objetivo del presente trabajo consistió en la caracterización de la UPR durante la infección por rotavirus. Encontramos que en células infectadas con rotavirus hay un incremento en el nivel del RNA mensajero de GRP78, GADD34 y CHOP, genes cuya transcripción se induce por el estrés del RE. Además observamos un aumento progresivo en el splicing del mRNA de XBP1. Estos resultados indicaron que la infección por rotavirus causa estrés del RE en la célula infectada. Sin embargo, cuando la actividad del promotor de los genes inducidos por el estrés se evaluó utilizando a la luciferasa como gen reportero, no se observaron cambios en la actividad de esta enzima, sugiriendo que la UPR no sólo se induce sino también se modula por el rotavirus. El uso de la técnica de RNA de interferencia permitió demostrar que la proteína no estructural NSP3 es el componente viral responsable de la modulación de la UPR y que el estrés del RE en la célula infectada lo causó varios procesos del ciclo replicativo de rotavirus.

II. ABSTRACT

The Unfolded Protein Response or UPR is induced when unfolded or misfolded proteins accumulate in the lumen of the Endoplasmic Reticulum (ER), known condition as ER stress. The UPR has been reported in both physiologic and pathologic conditions. In the case of viral infection, it has been described that some consequences of the UPR benefit while others limit the production of viral progeny. Interestingly, viruses have developed strategies to modify each one of the events of the UPR. The objective of this work was to characterize the induction of UPR during rotavirus infection. We found by real time RT-PCR assays an increase in the level of GRP78, GADD34 and CHOP mRNAs, genes whose transcription is induced by ER stress. In addition, we observed a progressive increase in the splicing of the XBP1 mRNA. These data indicated that rotavirus infection causes ER stress in the infected cell, however when the promoter activity of stress-induced genes was evaluated using luciferase as a reporter gen, we did not observe changes on the activity of this enzyme, suggesting that the UPR is not only induced but it is also modulated during rotavirus infection. Using RNAi to silence the expression of viral genes allowed us to demonstrate that the viral nonstructural protein NSP3 is the viral component responsible for modulation of the UPR, and that the ER stress in the infected cell might be caused by several steps of the replicative cycle of rotavirus.

III. INTRODUCCIÓN

El Retículo Endoplásmico (RE) es un organelo presente en todas las células eucarióticas y se extiende a partir del núcleo a través de una red de sacos aplanados membranosos que pueden tener ribosomas, organelos encargados de la síntesis de proteínas. Cerca de un tercio de las proteínas que se sintetizan por la célula se dirigen hacia el lumen del RE, donde adquieren el plegamiento y las modificaciones post-traduccionales necesarias para llevar a cabo su función. Algunas de las modificaciones post-traduccionales realizadas por proteínas residentes del RE incluyen, la adición de azúcares (glicosilación), la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento, entre otras. Las enzimas encargadas del plegamiento y la modificación post-traduccionales de proteínas mantienen un control de calidad que permite que sólo las proteínas plegadas correctamente y modificadas sean transportadas a su destino final, mientras que aquellas que no lograron adquirir el plegamiento correcto son enviadas al citoplasma de la célula, donde son degradadas por el proteasoma, uno de los sistemas de degradación proteica en la célula [1]. El RE participa también en la síntesis de lípidos, el colesterol [2] y algunos azúcares. Además de su capacidad biosintética, el RE funciona como un almacén dinámico de calcio (Ca^{2+}), un ión que participa en múltiples procesos celulares [3].

En los últimos años se ha descrito que además de las funciones antes mencionadas, el RE es un organelo que juega un papel central en la integración de diversas condiciones tanto fisiológicas como patológicas incluyendo cambios de

temperatura, alteración en la concentración de calcio intracelular, limitación de nutrientes e infección viral, entre otras [4]. Durante estas condiciones, la capacidad de plegamiento de las proteínas se rebasa o se altera, lo que da lugar a una acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas, condición conocida como estrés del RE. Para enfrentar dicho estrés, el RE inicia la respuesta a proteínas no plegadas o UPR, por sus siglas en inglés “Unfolded Protein Response”, la cual ajusta en forma integral y coordinada la actividad metabólica de la célula [5].

La UPR inicia con la actividad de tres proteínas transmembranales residentes del RE, las cuales funcionan como efectores o iniciadores de la respuesta; la cinasa de proteínas del RE (PERK), el regulador de la transcripción 6 (ATF6) y la enzima dependiente de inositol 1 (IRE1). Bajo condiciones no estresantes, las tres proteínas se encuentran unidas a Bip (immunoglobulin heavy chain binding protein, también conocida como GRP78, glucose-regulated protein 78), una de las chaperonas mas abundantes del RE. Cuando las proteínas no plegadas se acumulan, Bip se disocia de las tres proteínas efectoras; al disociarse, PERK e IRE1 se dimerizan y activan [6]. En el caso de ATF6, la separación de Bip da lugar a su relocalización al Aparato de Golgi, donde sufre proteólisis enzimática, lo cual resulta en su activación y translocación al núcleo para regular la expresión de sus genes blanco [7] (Figura 1A). La activación de los efectores primarios de la UPR resulta en la expresión de tres reguladores de la transcripción; ATF4, ATF6 y XBP1, los cuales a su vez controlan la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en diversas actividades celulares como

el plegamiento y la degradación de proteínas así como también el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de lípidos, entre otras. La función primaria de la UPR es corregir el defecto en el plegamiento de proteínas y ajustar la actividad del RE de acuerdo a la condición estresante presente, sin embargo cuando el estrés es severo o persistente la muerte celular es inducida [8] (Figura 1B).

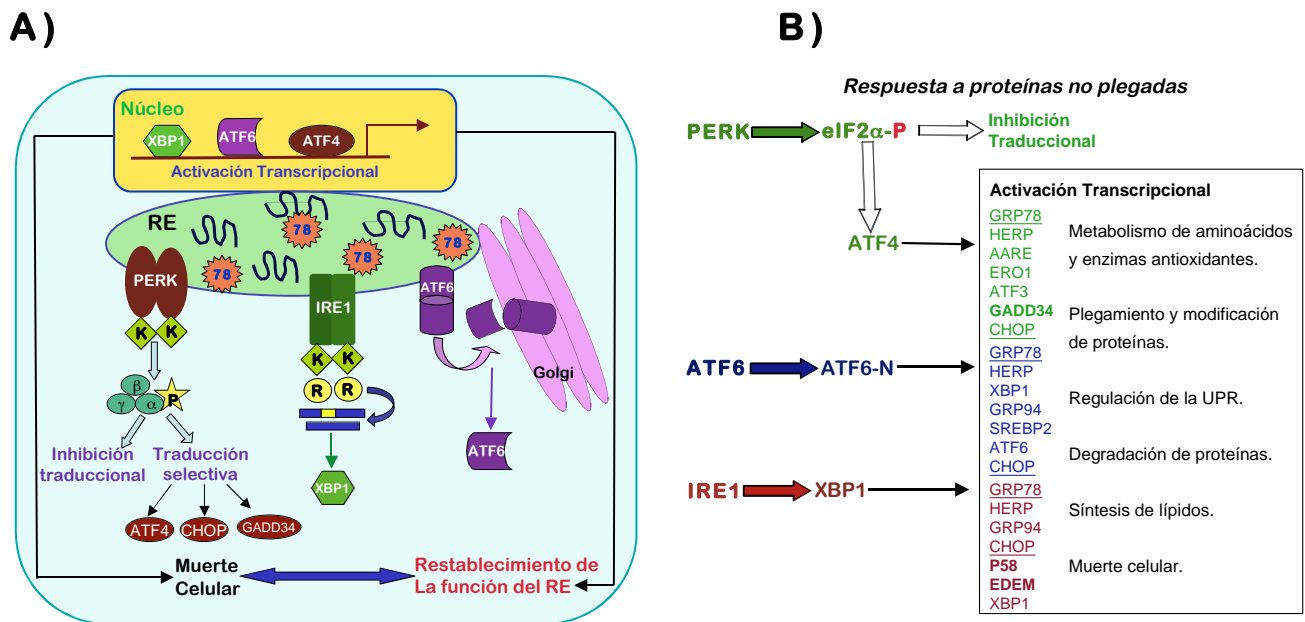


Figura 1. FUNCIÓN DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS NO PLEGADAS (UPR).

A) El estrés de RE da lugar a la UPR integrada por tres efectores primarios, cuya actividad resulta en la activación de tres factores transcripcionales que regulan múltiples genes involucrados en diversas funciones celulares que contribuyen al restablecimiento de las funciones del RE y/o a la muerte celular, dependiendo de la duración y la fuerza del estímulo de estrés. B) Efecto de los tres efectores de la UPR sobre la síntesis de proteínas y la activación transcripcional de distintos genes que codifican para múltiples proteínas que participan en diversos procesos celulares.

A continuación se describe de forma más detallada la función de cada uno de los efectores de la UPR.

1) Papel de PERK en la UPR

PERK pertenece a una familia de cinasas de proteínas que fosforilan la subunidad alfa (α) del factor de iniciación traduccional eucariótico 2, eIF2 α . Cada miembro de la familia de cinasas (PERK, PKR, GCN2 y HRI) responde a estímulos específicos de estrés, por ejemplo PERK se activa por estrés del RE, la actividad de PKR se dispara por la acumulación de RNA de doble cadena (dcRNA), generalmente producido durante la replicación viral, la actividad de GCN2 (cinasa de proteínas del control general 2) es inducida por la limitación de nutrientes e irradiación ultravioleta, y HRI se activa por cambios de temperatura y la formación de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo) [9].

eIF2 es un heterotrímero compuesto por tres subunidades (α , β y γ) que une GTP y al tRNA-Metionina iniciador, de esta manera forma lo que se conoce como el complejo ternario (CT). La función del CT es colocar la metionina iniciadora en la subunidad ribosomal pequeña 40S para iniciar la síntesis de proteínas. Durante este proceso, el GTP unido a eIF2 se hidroliza a GDP, el cual para recuperar su actividad, debe ser intercambiado por GTP por el factor eIF2B, y así poder realizar otra ronda de síntesis proteica. La fosforilación de eIF2 α aumenta su afinidad por eIF2B, lo cual impide el intercambio de GDP por GTP y da lugar al secuestro de eIF2 en complejos con eIF2B. La cantidad de eIF2B es limitante comparada con la del factor eIF2 α por lo

tanto, cambios pequeños en la fosforilación de eIF2 resultan en una inhibición de la síntesis de proteína celular [10] (Figura 2).

La fosforilación de eIF2 α no sólo reduce la síntesis de las proteínas en general, sino que también da lugar a un mecanismo de iniciación traduccional selectivo que favorece la traducción de un grupo de RNAs mensajeros (mRNAs) que incluye a los que codifican para los reguladores de la transcripción 3, 4, 5 (ATF3, ATF4 y ATF5), CHOP (proteína similar a la que se une al enhancer transcripcional, CCAAT) y la proteína GADD34 (gen 34 inducido por daño al DNA y arresto en el crecimiento celular), entre otros [11-15]. Estos mRNAs se caracterizan por tener marcos de lectura abiertos pequeños (upstream small open reading frames, uORFs) en la región 5' no traducida del mRNA. Estos uORFs codifican para péptidos pequeños que se sobrelapan con el ORF que da lugar a la proteína completa. El mecanismo preciso de la traducción de estos mRNAs no es claro aún, sin embargo, se propone que debido a la formación limitada de CTs causada por la fosforilación de eIF2 α , la exploración de la subunidad ribosomal pequeña sobre la región 5' no traducida del mRNA es más lenta e inicia varias veces lo que permite sobrepasar a los uORFs y alcanzar así al ORF que codifica para la proteína completa [12] (Figura 2). El mRNA que codifica para el factor transcripcional, ATF4 se traduce mediante el mecanismo de reiniciación traduccional previamente descrito y cuando se expresa activa la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, control del estrés oxidativo y el plegamiento de proteínas [16-17]. Entre los genes

regulados por ATF4, se encuentran los que codifican para los factores transcripcionales, ATF3 y CHOP [18], los cuales a su vez inducen la transcripción de diferentes genes involucrados en distintas actividades incluyendo la muerte celular. Los tres factores transcripcionales; ATF4, ATF3 y CHOP pertenecen a una familia de proteínas conocida como bZIP, la cual se caracteriza por poseer una región básica a través de la cual se unen al promotor de sus genes blanco y un dominio rico en leucinas, este último es responsable de la formación de los homodímeros o los heterodímeros de estas proteínas. Se ha descrito que dependiendo de su interacción con otras proteínas durante la condición estresante, los factores bZIP pueden promover o suprimir la transcripción de sus genes blanco [19]. Por ejemplo se sabe que ATF4, ATF3 o CHOP promueven la transcripción del gen que codifica para la proteína GADD34, la cual interacciona con la proteína fosfatasa 1 (PP1), cuya función es remover el fosfato del factor eIF2 α [20]. Por lo tanto, la expresión de GADD34 inducida por el estrés del RE representa un mecanismo de regulación negativa para la fosforilación de eIF2 α que permite el restablecimiento de la síntesis de las proteínas de la célula [21]. También se ha reportado que CHOP suprime la transcripción de genes que codifican para proteínas antiapoptóticas miembros de la familia Bcl-2, involucrada en el mantenimiento de la supervivencia celular [22]. En varios estudios, la capacidad de CHOP para suprimir la expresión de genes Bcl-2 se ha asociado con la muerte celular [23-24].

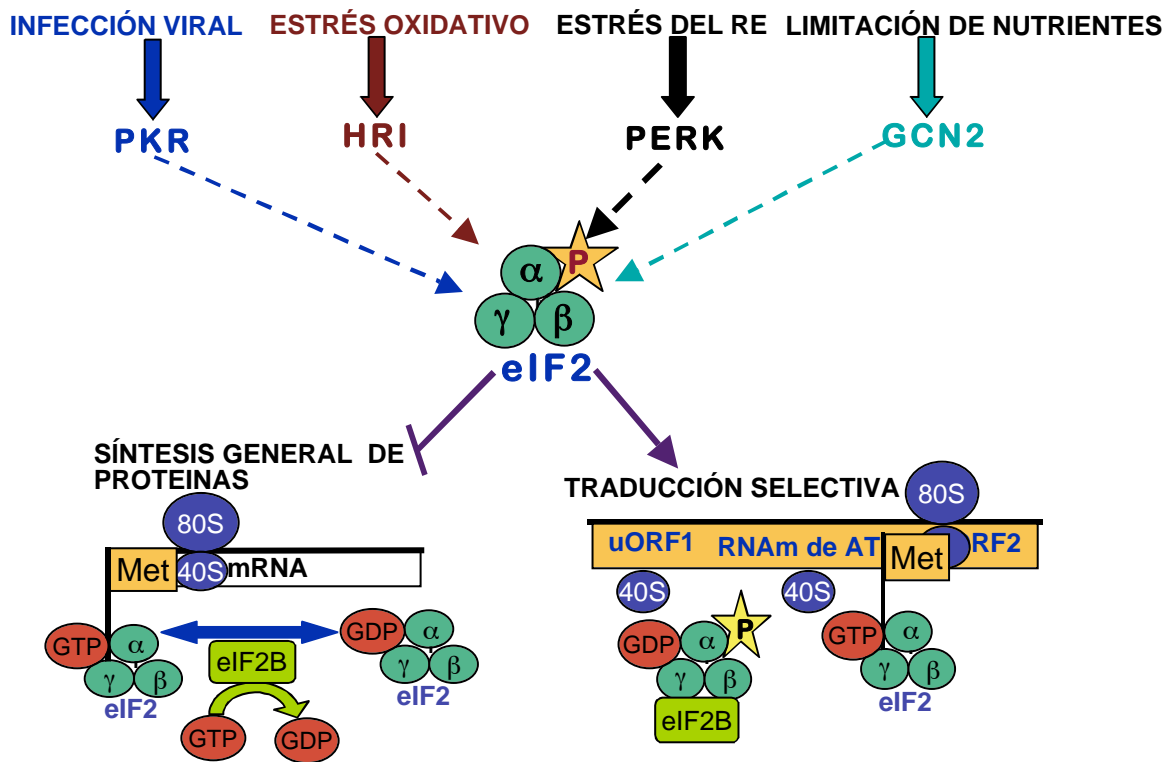


Figura 2. Regulación de la síntesis de proteínas durante el estrés.

En respuesta a condiciones específicas de estrés, se activan cinasas de proteínas que fosforilan al factor eIF2 α ; lo cual da lugar a una inhibición general de la síntesis de proteínas mientras que simultáneamente se favorece un mecanismo de traducción selectiva para un grupo de mRNAs que incluye al que codifica para el regulador transcripcional, ATF4.

2) Papel de ATF6 en la UPR.

El regulador de la transcripción ATF6, se sintetiza e inserta a la membrana del RE como un precursor proteico inactivo con un peso molecular aproximado de 90 kDa. Aunque en mamíferos existen dos proteínas homólogas de ATF6; ATF6 α y ATF6 β , sólo la función de ATF6 α se ha estudiado ampliamente. El dominio luminal de ATF6 α tiene secuencias de localización del Aparato de Golgi que son enmascaradas por la unión de Bip en condiciones no estresantes. El estrés del RE induce la

disociación entre ATF6 y Bip, lo que da lugar a la relocalización de ATF6 al Aparato de Golgi, donde se procesa secuencialmente por la proteasa 1 y la proteasa 2 (SP1 y SP2 respectivamente) [25]. El procesamiento proteolítico del precursor de ATF6 genera el regulador transcripcional funcional, cuyo peso molecular es de 50 kDa. ATF6 activo se dirige al núcleo donde promueve la transcripción de sus genes blanco. Entre los genes regulados por ATF6 se encuentran los que codifican para las proteínas GRP78, GRP94, calnexina, calreticulina y CHOP, entre otras [26]. Estas proteínas están implicadas en el plegamiento, la modificación post-traducciona de proteínas y la muerte celular. ATF6 regula también su propia transcripción y la del gen XBP1, cuyo mRNA es procesado por la endorribonucleasa IRE1, estableciendo así un mecanismo de autorregulación positiva con la capacidad para amplificar o mantener una UPR continua en el caso de un estrés crónico en el RE. Ambos reguladores de la transcripción, ATF6 y XBP1 son miembros de la familia bZIP que promueven la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de lípidos, lo cual favorece la biogénesis del RE [27-28].

3) Papel de IRE1 en la UPR.

IRE1 es una enzima con un peso molecular aproximado de 110 kDa con dos isoformas conservadas, IRE1 α e IRE1 β . IRE1 α se expresa ubicuamente mientras que la expresión de IRE1 β está restringida al epitelio intestinal. IRE1 α es una enzima bifuncional con actividad de cinasa y de endorribonucleasa [29]. La auto-fosforilación de IRE1 se necesita para que esta enzima realice la función de endorribonucleasa, a

través de la cual remueve un intrón de 26 nucleótidos del pre-mRNA que codifica para el factor transcripcional XBP1 [30]. Este tipo de modificación representa un procesamiento o splicing no convencional, porque generalmente este tipo de modificación post-transcripcional se lleva a cabo en el núcleo celular [31]. La remoción del intrón en el mRNA de XBP1 provoca un cambio de marco de lectura que favorece su síntesis y por lo tanto su actividad transcripcional. Entre los genes que son regulados por XBP1 se encuentran chaperonas como GRP78 y GRP94, así como también genes involucrados en la degradación de proteínas como EDEM y P58, entre otros [32]. Recientemente se reportó que la capacidad de XBP1 para promover la transcripción de los genes implicados en la degradación de proteínas incrementa considerablemente cuando XBP1 forma heterodímeros con ATF6 [33]. Es importante mencionar que además de participar en la degradación de proteínas, P58 funciona como inhibidor de las cinasas de proteínas PERK y PKR [34-36]. Por lo tanto, P58 constituye otro mecanismo de regulación negativo de la UPR a nivel de las cinasas de eIF2 α .

Una descripción breve sobre el efecto de cada uno de los componentes de la UPR durante la replicación de distintos virus se incluye como anexo 1.

4) Generalidades de Rotavirus

a) Historia

Los rotavirus, pertenecientes a la familia *Reoviridae* se describieron en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores, quienes observaron al microscopio electrónico

biopsias de intestino delgado de niños que presentaron diarrea severa de origen no bacteriano. En base a la morfología que presentaron estos virus, cuya apariencia al microscopio era la de una rueda de carreta antigua, éstos virus se bautizaron con el nombre de rotavirus, del latín rota, que quiere decir rueda [37].

b) Estructura Viral

Los rotavirus son partículas con geometría icosaédrica, con un diámetro aproximado de 75 nanómetros (nm) y están compuestas por tres capas concéntricas de proteína. La capa externa del virión está formada por la glicoproteína VP7. A partir de esta capa se proyectan espículas formadas por la proteína VP4. La capa intermedia está formada por la proteína VP6 que a su vez, rodea a la capa interna o nucleocápside formada por la proteína VP2, la cual engloba al genoma viral constituido por once segmentos de ácido ribonucleico de doble cadena (dcRNA), que varían en tamaño desde aproximadamente 600 pb para el más pequeño, hasta aproximadamente 3000 pb para el más grande. La separación electroforética del genoma de rotavirus resulta en un patrón característico que es la base para uno de los sistemas de diagnóstico de este virus. Cada segmento de dcRNA codifica para una proteína, excepto el segmento once que codifica para dos proteínas; dando como resultado la expresión de doce proteínas, de las cuales seis forman parte de la partícula viral, llamadas VP (del inglés viral protein): VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y seis son no estructurales (NSP: Non-structural protein): NSP1-NSP6 (Figura 3). El nombre de las proteínas estructurales está basado en su peso molecular, siendo VP1

la más grande, de 125 kDa y VP8, uno de los productos de corte con tripsina de VP4, la más pequeña, de 28 kDa [38].

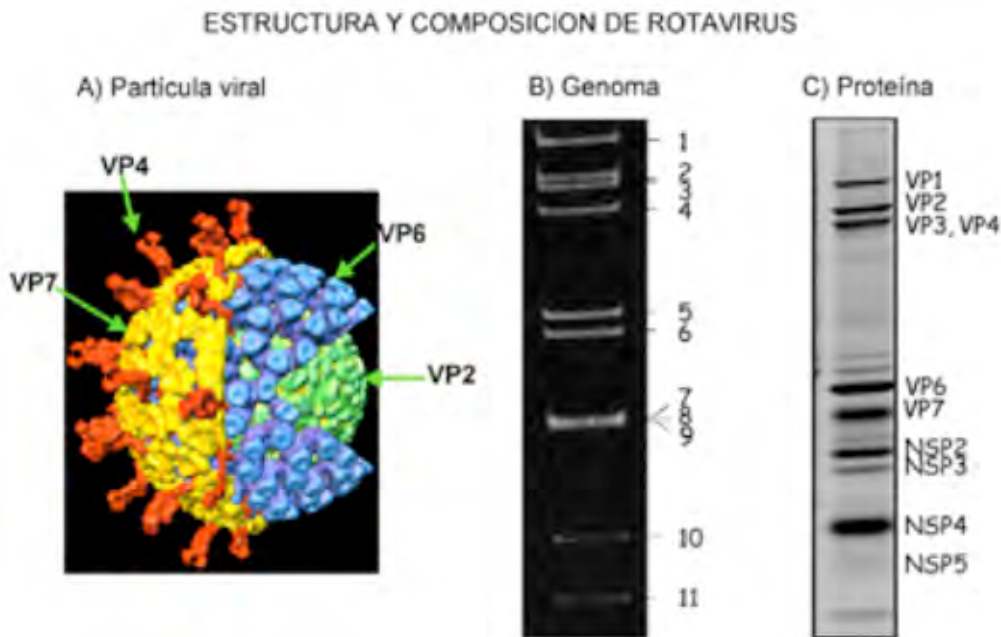


Figura 3. Estructura y composición de Rotavirus.

A) Imagen de criomicroscopía electrónica de la estructura tridimensional de un virión maduro (TLP), se muestran las tres capas de proteínas en colores. B) Patrón electroforético de los segmentos de dsRNA constituyentes del genoma de rotavirus. C) Patrón electroforético de las proteínas de rotavirus.

5) Ciclo replicativo de rotavirus

a) Unión y entrada

Una infección viral inicia con la unión y la entrada de un virus a la célula huésped. En el caso de rotavirus se ha descrito que el proceso involucra varios pasos y requiere del procesamiento de VP4 con tripsina, lo cual genera dos péptidos; VP8 de 28 kDa y VP5 de 60 kDa [39]. Una vez procesada VP4, inicia una serie de

interacciones secuenciales y específicas entre las proteínas virales y diferentes proteínas localizadas en la superficie celular. Varias proteínas celulares que funcionan como receptores o coreceptores de los rotavirus han sido descritas e incluyen: el ácido siálico, integrinas, como $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2$, la proteína de choque térmico HSC70 y algunos gangliósidos [40]. En un estudio reciente, la caracterización de la entrada de cuatro cepas diferentes de rotavirus en la línea celular MA104 permitió conocer que aún cuando la cepa de simio (RRV), la cepa humana (Wa), la cepa porcina (TFR1-41) y la cepa bovina (UK) comparten el requerimiento por algunos receptores como la proteína de choque térmico HSC70 y el colesterol, sólo tres de ellas (Wa, TFR-41 y UK) entran a la célula huésped a través de la vía endocítica mediada por clatrina [41]. El mecanismo por el cual RRV ingresa a la célula huésped aún no está completamente definido y probablemente alguna vía endocítica aún no descrita esté implicada, ya que el análisis de vías de endocitosis actualmente conocidas no parecen estar involucradas.

b) Transcripción de RNA viral, replicación del genoma y traducción.

Durante o inmediatamente después de entrar a la célula, la partícula viral pierde la capa externa. Aunque se desconoce el mecanismo a través del cual las proteínas de la capa externa de rotavirus se disocian del virión, se ha propuesto que una serie de cambios conformacionales en estas proteínas, posiblemente provocados por una reducción en la concentración de calcio en el interior de la célula, contribuyen al desnudamiento del virión [42]. La pérdida de las proteínas VP4 y VP7,

genera una partícula de dos capas o DLP, la cual es activa transcripcionalmente (Figura 4).

La RNA polimerasa viral VP1, es la encargada de la síntesis del RNA mensajero viral, el cual tiene CAP en el extremo 5' pero carece de un segmento de poli A característico de la mayoría de los RNAs mensajeros celulares. Además de su función como mRNAs, estos también sirven como moldes de RNA para la síntesis de RNA de polaridad negativa para formar los segmentos de dcRNA que componen al genoma viral [43]. Aunque se desconoce el mecanismo, estudios previos del laboratorio demostraron que además de la polimerasa VP1, las proteínas virales VP2, VP3 y VP6 ejercen un papel importante no sólo en la transcripción sino también en la replicación del genoma viral, ya que el silenciamiento de cualquiera de ellas por RNA de interferencia, causa una inhibición en la síntesis del mRNA y el dcRNA. También se demostró que el silenciamiento de VP2 y VP6 dió lugar a una reducción severa en la síntesis de proteína viral, indicando que estas proteínas podrían también participar directa o indirectamente en la traducción de los mRNAs virales [44]. La traducción de los transcritos virales da lugar a seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1-NSP6). Las proteínas virales VP7 y NSP4, son glicoproteínas que durante su traducción son translocadas al RE donde sufren modificaciones post-traduccionales específicas que les permite integrarse a las membranas del RE. La acumulación de una masa crítica de proteínas virales en el citoplasma de la célula infectada da lugar a la formación de estructuras conocidas

como viroplasmos, los cuales se caracterizan por la presencia de las proteínas, VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2 y NSP5. En los viroplasmos se lleva a cabo la transcripción y la replicación del genoma viral así como el inicio de la morfogénesis, proceso a través del cual se ensambla la progenie viral [45] (Figura 4).

c) Morfogénesis y liberación del virus.

Una vez formados en los viroplasmos, las partículas de dos capas de proteínas o DLPs geman a través de la membrana del RE adquiriendo durante este proceso una membrana lipídica y la incorporación de las proteínas virales VP4, NSP4 y VP7. La concentración elevada de calcio en el interior del RE favorece la reorganización de la capa externa del virus que excluye a la envoltura lipídica y a la proteína NSP4, generándose así las partículas infecciosas maduras de tres capas (TLPs) [46]. Finalmente, las partículas infecciosas son liberadas al medio extracelular mediante la lisis de la célula infectada (Figura 4).

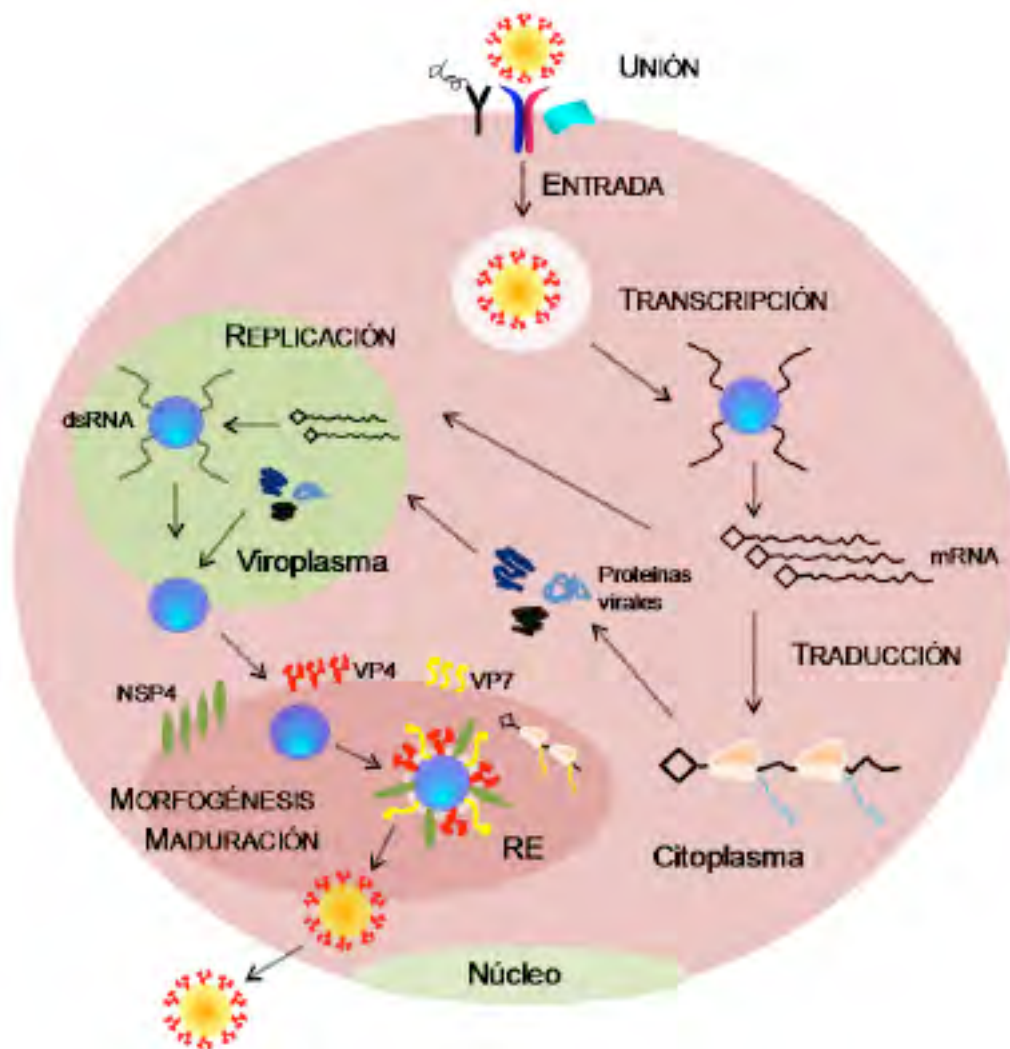


Figura 4. Ciclo replicativo de los rotavirus.

Se muestran las principales etapas del ciclo, desde que rotavirus se une a sus receptores celulares y entra a la célula hospedera hasta que las nuevas partículas son liberadas mediante lisis celular (Tomada de la tesis de doctorado de Michelle Gutierrez Mayret).

6) Patogénesis Viral

La diarrea aguda infecciosa es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años tanto en países en desarrollo como desarrollados. Entre los agentes infecciosos que causan diarreas, los rotavirus representan uno de los principales agentes patógenos, siendo responsables de

alrededor de dos millones de hospitalizaciones y de la muerte de 600,000 niños al año en todo el mundo [47]. Los síntomas que generalmente se presentan durante la infección por estos virus son: más de ocho evacuaciones al día, vómito y ocasionalmente fiebre. La duración promedio de esta enfermedad es de cinco días y la gran mortalidad asociada a ella, se debe a la deshidratación severa que provoca la infección, por lo que es muy importante hidratar a los niños para mantener su equilibrio electrolítico. En la infección, los rotavirus se excretan en grandes cantidades durante los episodios diarreicos por lo que el diagnóstico se realiza mediante la detección directa del virus en heces a través de inmunoensayos o electroforesis del genoma viral [48]. La ruta principal de transmisión es la vía fecal-oral, aunque también se piensa que el contacto de persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas pueden ser fuente de transmisión.

Los rotavirus infectan primordialmente los enterocitos diferenciados, localizados en la punta de las micro vellosidades del intestino delgado, causando muerte celular y descamación [49]. Entre los mecanismos patofisiológicos asociados con la diarrea causada por rotavirus se encuentran: metabolismo celular alterado, concentración elevada de calcio intracelular, síntesis de la enterotoxina viral NSP4, estimulación del sistema nervioso entérico, y muerte celular.

Si bien la diarrea inducida por rotavirus ha sido asociada con diferentes efectos en sus células blanco, los mecanismos todavía no son completamente entendidos. Por

esta razón, se necesita continuar con el estudio de la patogénesis producida por estos virus. Debido a las dificultades para cultivar células intestinales diferenciadas, los diferentes eventos del ciclo de vida de rotavirus, se han estudiado en líneas celulares de origen intestinal y renal como HT-29, Caco-2, HEK 293 y MA104, las cuales son susceptibles a la infección por estos virus. Además la falta de un sistema de genética reversa capaz de introducir mutaciones en el genoma de rotavirus, dificultó por mucho tiempo el estudio de las funciones de las proteínas virales en el contexto de una infección celular. Sin embargo, el uso de la técnica de RNA de interferencia (RNAi), la cual permite el silenciamiento post-transcripcional de un gen, ha hecho posible investigar la función no sólo de proteínas virales sino también de proteínas celulares involucradas en la respuesta inmune del huésped, la replicación y la patogénesis viral.

7) Inducción y modulación de la respuesta de interferón en células infectadas con rotavirus.

El ingreso de los virus a la célula huésped es inmediatamente detectado por varias proteínas celulares incluyendo aquellas que forman parte de la respuesta inmune innata, la primera línea de defensa contra la infección viral. Entre los mecanismos de la inmunidad innata es importante mencionar a los receptores TLR (Toll-Like Receptors), las RNA helicasas RIG-I (gen 1 inducible por ácido retinoico), MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma) y LGP2 (laboratorio de genética y fisiología 2), así como también la cinasa PKR, la enzima oligoadenilato sintetasa (OAS) y la RNAasa L, entre otras [50-51]. Estas proteínas celulares están

localizadas tanto en la superficie como en el citoplasma celular donde reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que incluyen a carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos ó combinaciones de estos. Por lo tanto, los eventos de la infección viral, incluyendo la entrada, la transcripción y la replicación del genoma, así como la expresión de proteínas virales pueden activar la respuesta inmune innata. El reconocimiento de PAMPs por receptores celulares dispara diferentes vías de señalización intracelular que convergen en la activación del factor nuclear-*kappa* B (NF- κ B) y los factores regulatorios de interferón (IRFs), los cuales promueven la transcripción de genes que codifican para citocinas inflamatorias e interferones. Las citocinas inflamatorias alertan y reclutan a las células del sistema inmune como los macrófagos y las células dendríticas estableciéndose así una respuesta inmune adaptativa de mayor duración y especificidad, mientras los interferones (IFN) forman parte de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas, IFN-alfa (α) y una proteína de IFN-beta (β) que ejercen distintas funciones biológicas incluyendo actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomodulatorias [52].

Una vez que son sintetizados y secretados por las células infectadas, los interferones actúan de manera autocrina y/o paracrina, cuando se unen directamente al receptor IFNAR localizado en la superficie celular. La unión del interferón a su receptor dispara distintas vías de señalización intracelular que dan lugar a la activación de los factores transcripcionales (IRFs) que promueven la transcripción de

genes estimulados por IFN (ISGs), los cuales restringen la replicación viral a través de distintos mecanismos celulares. La acción conjunta de interferones e ISGs promueve la muerte de las células infectadas y protege a las células vecinas contra la infección, controlando así la replicación y la diseminación de los virus [53].

Estudios *in vitro* demostraron que la expresión heteróloga de la proteína viral VP4 producida en forma recombinante o la incubación de células con rotavirus irradiado con luz ultravioleta, activa componentes de la respuesta inmune innata. Éstos resultados en conjunto, llevaron a proponer que el inicio de la respuesta inmune innata depende de receptores que reconocen eficientemente el ingreso de moléculas extrañas al citoplasma celular y que la replicación de los rotavirus no se requiere para despertar dicha respuesta [54-55]. Por otro lado, estudios *in vivo* demostraron que las helicasas RIG-1 y MDA5 son responsables del reconocimiento de los rotavirus y la señalización celular que conduce a la producción de IFN β , el cual reduce la eficiencia replicativa de los rotavirus en el epitelio intestinal [56].

Aun cuando la presencia de los rotavirus dispara la respuesta de interferón en la célula huésped, estos virus ha desarrollado múltiples estrategias para impedir no sólo la síntesis sino también la señalización de ésta respuesta inmune innata. La primera evidencia que sugirió que rotavirus modulaba la respuesta de IFN se describió por Graff y colaboradores, quienes encontraron que la proteína viral NSP1 de rotavirus bovino (B641) interacciona con el factor regulatorio de interferón tipo 3 (IRF3) y que dicha interacción resulta en la degradación del complejo proteico

formado [57]. Posteriormente se demostró que la proteína NSP1 de la cepa de rotavirus de simio (SA11) interacciona con los factores regulatorios de interferón tipo 3, 5 y 7 (IRF3, IRF5 e IRF7), lo cual conduce también a la degradación de estas proteínas celulares [58]. La presencia de un dominio de zinc en la proteína NSP1, similar al que está presente en proteínas ligasas de ubiquitina tipo 3 (E3) llevó a proponer que NSP1 tiene actividad de E3 ligasa e induce la degradación de los IRFs a través de ubiquitarlos [59]. Por otro lado, el estudio de la respuesta de IFN en células infectadas con la cepa de rotavirus porcino (OSU) permitió conocer que este virus utiliza otro mecanismo para impedir la expresión de IFN- β ; en este estudio se observó que la proteína NSP1 promueve la degradación de la proteína celular β -TrCP, una proteína E3 ligasa que participa en la degradación del inhibidor del factor NF- κ B ($I\kappa$ B α). El factor NF- κ B se regula primariamente por la fosforilación de sus proteínas inhibitorias, las $I\kappa$ Bs, que lo retienen en el citoplasma de las células sin estimular, sin embargo la activación de algunas vías de señalización intracelular conducen a la fosforilación y subsecuente degradación de las $I\kappa$ Bs, lo cual permite la translocación y la activación transcripcional del factor NF- κ B. La degradación de β -TrCP causada por la NSP1 de rotavirus porcino entonces impide la degradación de $I\kappa$ B α , y por lo tanto la activación de la vía NF- κ B. Interesantemente, en este trabajo se encontró al factor NF- κ B en asociación con los viroplasmos, sugiriendo el secuestro de NF- κ B como un mecanismo adicional para la regulación de IFN β [60].

Aunque se desconoce el componente viral implicado, se ha descrito que rotavirus también inhibe la señalización de IFN que da lugar a la expresión de los ISGs. En un estudio realizado con la cepa humana (Wa) y la de simio (RRV), se encontró que las proteínas transductoras de señales y reguladores de la transcripción, STAT1 y STAT2 son fosforiladas pero no translocadas al núcleo celular donde ejercen su actividad transcripcional [61]. En resumen, los estudios previamente descritos indican que los rotavirus poseen mecanismos diferentes para interferir con la activación transcripcional de los genes de interferón e ISGs. Cabe mencionar que se ha encontrado que el mecanismo utilizado por los rotavirus para modular la respuesta de interferón varía entre las distintas cepas virales y depende del tipo celular que se analice [62].

IV. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se describió que el ensamble final de las partículas infecciosas de rotavirus ocurre en el RE, donde la interacción de chaperonas con proteínas virales, facilita la producción de progenie viral infecciosa [46 y 63]. También se demostró que la infección por rotavirus causa la fosforilación del factor del inicio de la traducción $eIF2\alpha$, desde las primeras horas de infección y ésta se mantiene a lo largo del ciclo replicativo del virus. Interesantemente, se inhibe la síntesis de proteína celular mientras que la síntesis de proteína viral es muy eficiente [64]. El hecho de que la fosforilación de $eIF2\alpha$ se mantenga a lo largo del ciclo replicativo de rotavirus, sugirió no sólo la activación de alguna de las cinasas del

factor eIF2 α sino también la modulación de esta respuesta por los rotavirus. Además, resultados preliminares mostraron un incremento en el nivel del mRNA de algunos genes inducidos por el estrés del RE, lo cual en conjunto con los reportes previamente descritos llevaron a proponer la hipótesis de que la infección con rotavirus causa estrés del RE y que el virus modula la respuesta a proteínas no plegadas. Con el fin de confirmar esta hipótesis y entender mejor las interacciones entre rotavirus y la célula huésped, en este trabajo se caracterizó la respuesta de estrés del RE o UPR en células infectadas por rotavirus. Para ello se propusieron los siguientes objetivos:

V. OBJETIVOS

V. 1 Objetivo general

Caracterizar la respuesta a proteínas no plegadas en células infectadas por rotavirus.

V. 2 Objetivos particulares:

- 1.- Examinar la actividad de endorribonucleasa de IRE1 y la capacidad de XBP1 para promover la transcripción de sus genes blanco.
- 2.- Evaluar la activación y la actividad transcripcional del factor ATF6.
- 3.- Determinar si el estado fosforilado del factor de inicio de la traducción eucariótico, eIF2 α inducido por la infección por rotavirus da lugar a la traducción selectiva del mRNA que codifica para ATF4.
- 4.- Determinar cuál (es) son las proteínas virales responsables de la activación y/o el

control de la UPR durante la infección por rotavirus.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo celular y virus. En este trabajo se utilizó la línea celular MA104, la cual es derivada de riñón de mono Rhesus y es susceptible a la infección por rotavirus. Las células se crecieron en DMEM Advanced suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB). Se utilizó la cepa de rotavirus de simio RRV, donada por el Dr. B. Greenberg (Universidad de Stanford, California) Previo a la infección, la cepa RRV se activó con tripsina (10 $\mu\text{g/ml}$, GibcoBRL) por 30 min a 37 °C.

Los anticuerpos policlonales contra las partículas purificadas (TLPs), la proteína NSP3, NSP5 y la proteína vimentina (recombinante), se produjeron en el laboratorio como se ha descrito previamente [65].

Para asegurar la infección de todas las células en cultivo, en todos los experimentos se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 10.

Como control positivo, se trataron células MA104 por 9h con taspigargina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), un inhibidor de la ATPasa dependiente de calcio localizada en el RE.

Plásmidos.

El plásmido GRP78-luc fue generosamente donado por el Dr. Mori, (Universidad de Kyoto, Japón [66]). GRP78-luc contiene el fragmento (-304 al + 34) de la región promotora del gen GRP78; el cual posee varias copias del elemento de respuesta a estrés del RE (ERSE), seguidas de la región codificante de la luciferasa de luciérnaga.

El fragmento también incluye un sitio ATF/CRE, importante también en la regulación transcripcional de este gen.

El plásmido CHOP-luc fue donado por el Dr. Wong, (Universidad de Hong Kong [67]).

CHOP-luc contiene la región (-644 al +91) del promotor del gen CHOP; el cual tiene varias copias del elemento de respuesta a estrés del RE (ERSE), seguidas de la región codificante de la luciferasa de luciérnaga.

El plásmido 5XATF6-luc fue donado por el Dr. Prywes, (Universidad de Columbia, New York, USA [68]). 5XATF6-luc contiene cinco copias de la secuencia consenso de unión para la proteína ATF6 activa fusionada a la región codificante del gen de la luciferasa de luciérnaga y manejada por el promotor mínimo del gen c-fos.

El plásmido mUTR-ATF4-luc fue donado por el Dr. Ron, (Universidad de Cambridge, UK [69]). Éste tiene la región 5'-no traducida del mRNA de la proteína ATF4 murina, fusionada a la región codificante de la luciferasa de luciérnaga y está bajo el promotor de la cinasa de timidina de Herpes simplex tipo 1 (HSV-1)

El plásmido pRL-TK fue donado por la Dra. R, García-Villegas (Cinvestav, México) y contiene la región codificante de la luciferasa de Renilla y está bajo el promotor de la cinasa de timidina de HSV-1. Con el fin de normalizar la eficiencia de transfección en las células MA104, el plásmido pRL-TK se cotransfectó con cada uno de los plásmidos marcadores de estrés del RE. Cabe mencionar que la expresión del plásmido pRL-TK no se modificó a los tiempos de infección evaluados.

RT-PCR en tiempo real. Monocapas de células MA104 confluentes en placas de 48 pozos se infectaron con rotavirus y cosecharon a distintos tiempos después de la infección utilizando TRIzol. Para eliminar la posible contaminación con DNA, el RNA total purificado se incubó con DNAasa libre de RNAasas (Roche). El nivel del RNA mensajero de los genes regulados por el estrés del RE se determinó mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real. Cada mezcla de reacción incluyó de 100-200 ng de RNA total, 10 μ l de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0.1 μ l de transcriptasa reversa 50U/ μ l (Applied Biosystems), 0.17 μ l de inhibidor de RNAasa 20U/ μ l (Invitrogen) y 2 μ l de oligos (2.5 pmol/ μ l) en un volúmen final de 20 μ l. Las amplificaciones se realizaron empleando el siguiente protocolo: transcripción reversa; 30 min a 48°C; inactivación de la RT 10 min a 95°C; PCR: 40 ciclos 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C y la fase de disociación fue por 30 min de 60°C a 95°C en un sistema de detección ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). En cada muestra, el nivel del RNA mensajero de cada uno de los genes evaluados se normalizó con el nivel del mRNA de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [70]. Los resultados se expresan como el número de veces de aumento o disminución con respecto al control que se establece como 1 en cada experimento. La secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada mRNA se muestran en la Tabla 1.

RT-PCR

El procesamiento o el splicing del pre-RNA de XBP1, se determinó mediante ensayos de RT-PCR. Monocapas de células MA104 infectadas con rotavirus se cosecharon a distintos tiempos post-infección utilizando TRIzol (Invitrogen). A partir de 1 μ g de RNA total, el cDNA de XBP1 se sintetizó y amplificó utilizando la transcriptasa reversa M-MuLV, la polimerasa Vent (BioLabs, New England) y el par de oligonucleotidos (5'-CTGGAACAGCAAGTGGTAGA-3' and 5'-CTGGGTCCTTCTGGGTAG-3') previamente reportados [71]. Los productos de PCR producidos en el ensayo se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida al 6 %. Posteriormente, los dos productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante la tinción con bromuro de etidio y el uso de un analizador de imágenes Thyphoon. El tamaño de los transcritos es de 424 y 398 bp y corresponden al mRNA de XBP1 sin procesar y procesado respectivamente (XBP1-S y XBP1-U). Para determinar el grado de splicing del mRNA de XBP1, se realizó un análisis densitométrico de las bandas utilizando el programa Image Quant TL (Amershan Biosciences). En la parte inferior de cada una de las figuras mostradas, se indica el porcentaje de splicing del mRNA de XBP1, el cual se calculó considerando como el 100% la suma de los valores obtenidos con los dos productos (XBP1-U + XBP1-S) presente en cada condición experimental.

Transfección de plásmidos y determinación de la actividad de luciferasa.

Monocapas de células MA104 crecidas a subconfluencia en placas de 48 pozos se transfectaron utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo a

las recomendaciones del fabricante. Para cada pozo se utilizó 1 μg de DNA en el caso de TK-mATF4-UTR-luc y 5XATF6-luc y 250 ng para el caso de GRP78-luc o CHOP-luc. Como se mencionó en materiales y métodos, cada uno de los plásmidos reporteros se cotransfectó con el plásmido control pRL-TK, el cual tiene la región codificante de la luciferasa de Renila. Después de 8 h, el medio de transfección se reemplazó por DMEM suplementado con 2% de SFB. Al día siguiente, las células se infectaron con rotavirus o se trataron con taspigargina. A distintas horas post-infección (hpi), las células se cosecharon utilizando el buffer de lisis de un kit comercial (Promega Madison, WI, USA). Posteriormente, en los lisados totales se determinó la actividad de las dos luciferasas utilizando el luminómetro (Monolight 3010) y los reactivos del kit de Promega. La actividad de la luciferasa de luciérnaga se dividió entre la actividad de la luciferasa de Renila. La relación de ambas luciferasas se expresa en porcentaje tomando como el 100% el valor obtenido en los lisados de células no infectadas o sin tratamiento.

Cotransfección de plásmidos reporteros de luciferasa y siRNAs interferentes.

Los RNAs interferentes (siRNAs) utilizados en este trabajo se obtuvieron de Dharmacon Research (Lafayette, CO) y la secuencia se publicó previamente [64]. Como control no relacionado (IRR), se utilizó un siRNA dirigido contra la proteína verde fluorescente. La transfección de siRNAs y plásmidos reporteros se realizó utilizando el método de transfección reversa. Brevemente, en 1 ml de MEM se

diluyeron 15 μl de oligofectamina, ésta mezcla se incubo por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 90 μl de una mezcla conteniendo 200 pmol/ml de los siRNAs y el plásmido reportero correspondiente, a cada pozo de una placa de 48 pozos. Después de un período de incubación de 20 min a temperatura ambiente, se agregaron 200 μl de una suspensión de células ($1.5 \times 10^5/\text{ml}$) a cada pozo y se incubaron a 37°C por 24 h. Al día siguiente, la mezcla de transfección se retiró y las células se lavaron dos veces con DMEM e infectaron con rotavirus o se trataron con taspigargina. Nueve horas post-infección o post-tratamiento con taspigargina, las células se lisaron con el buffer del kit de promega. En los lisados totales se determinó la actividad de las luciferasas y se visualizaron las proteínas mediante inmunoblots. Los cambios relativos se calcularon tomando como el 100% el valor obtenido en células no infectadas y tranfectadas con el siRNA no relacionado.

Marcaje Metabólico

Para el marcaje metabólico de las proteínas, células crecidas en placas de 48 pozos previamente transfectadas con los siRNAs e infectadas con rotavirus fueron incubadas por 30 min antes de la cosecha con el medio de cultivo MEM sin metionina, suplementado con 25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de Easy-tag express- ^{35}S (Dupont NEN, Boston, MA). Después del período de marcaje, las células se cosecharon con el buffer de lisis Laemmli (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1 % de azul de bromofenol, 10% de glicerol y 1% de β -mercaptoetanol). Las proteínas marcadas se separaron por electroforésis en gel de poliacrilamida al 10%, seguido de autoradiografía.

Inmunoblot

En los lisados celulares, también se detectó mediante ensayos de inmunoblot la expresión de proteínas virales y celulares. Los lisados se diluyeron en buffer Laemmli y se desnaturalizaron mediante ebullición por 5 min. Después, las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) durante 1 h a 130 mA, en amortiguador CAPS (10 mM pH 11) y metanol al 10%. Posteriormente las membranas se bloquearon durante 1 h a TA o toda la noche a 4°C con leche descremada al 5% (Carnation) preparada en TBS-Tween (TBS: NaCl 150 mM, KCl 2.6 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, suplementado con Tween al 0.1%). Después, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en la solución de bloqueo. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0.1% durante 15 min y posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario, especie-específico acoplado a peroxidasa durante 1 h a TA. Al finalizar esta incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.1% y los inmunoblots se revelaron con el uso de un sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa (Perkin-Elmer Life Sciences, MA) y exponiendo la membrana a una película fotográfica (Kodak). La intensidad de las bandas se cuantificó empleando el programa ImagePro Plus versión 5.0. Previo a la inmunodetección, las proteínas desnaturalizadas se separaron por SDS-PAGE al 10% y se tiñieron con azul de coomasie para ajustar y normalizar la cantidad de proteína

total presente en cada muestra. La inmunodetección de vimentina como control de carga se muestra en cada figura.

Inmunofluorescencia

Monocapas de células MA104 crecidas en cubreobjetos se transfectaron por 24 h con el plásmido 5XATF6-luc. Posteriormente las células se infectaron con rotavirus por 9 h. Transcurrido el tiempo de infección, las células se lavaron con PBS para eliminar el remanente de medio de cultivo y se fijaron por 20 min con paraformaldehído al 4% preparado en PBS. Después de la fijación, las células se lavaron 4 veces con PBS-NH₄Cl 50 mM. Para la permeabilización de las células, éstas se incubaron por 15 min a TA con BSA al 1% preparada en PBS con cloruro de amonio y Tritón X-100 al 0.5%. Una vez permeabilizadas, las células se lavaron 4 veces con PBS-NH₄Cl y se incubaron toda la noche a 4°C con la solución de bloqueo: BSA al 1% preparada en PBS- NH₄Cl 50mM. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en solución de bloqueo y entre cada incubación de anticuerpo (1h a TA), se hicieron 4 lavados con PBS-NH₄Cl 50 mM. Finalmente, se tiñeron los núcleos mediante la incubación de las células con DAPI y se montaron con Fluokept (Argene, Verniolle, French).

Análisis estadístico.

En las gráficas, los resultados se reportan como el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las líneas sobre las barras representan el error estándar. Para determinar la significancia estadística se realizó un análisis de varianza y los cambios encontrados con un valor de ANNOVA $p < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los oligos utilizados para RT-PCR en tiempo real.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
GRP78	ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	TGCCGTAGGCTCGTTGATG
CHOP	GCTCTGATTGACCGAATGGT	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
GADD34	GAGGGCAGGGAAGTCAATTT	TCCTCCCCTGGGTTCTTATC
EDEM	CTCCTCTACCAGGCAACCAA	GGCGTACCCACACTTGACTT
P58	CATGAAAACAGAGCCAAGCA	TCAACAGGCTTGTCGTCCTT
IRE1	GGAGAGAAGCAGCAGACTTTG	TCGCCCAAGATACAGAAGAGA
XBP1	TGGATTCTGGCGGTATTGA	GGAAGGGCATTGAAGAACA
NSP1	TACTTGCCGCATTATCAACATCA	AAATGTCAGCTTTTATTCTCCCCA
Luciferasa (luciérnaga)	GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT	ACACCTGCGTCGAAGATGT
Luciferasa (renilla)	GTGCCACATATTGAGCCAGT	CCATTACCAGATTTGCCTGA

VII. RESULTADOS

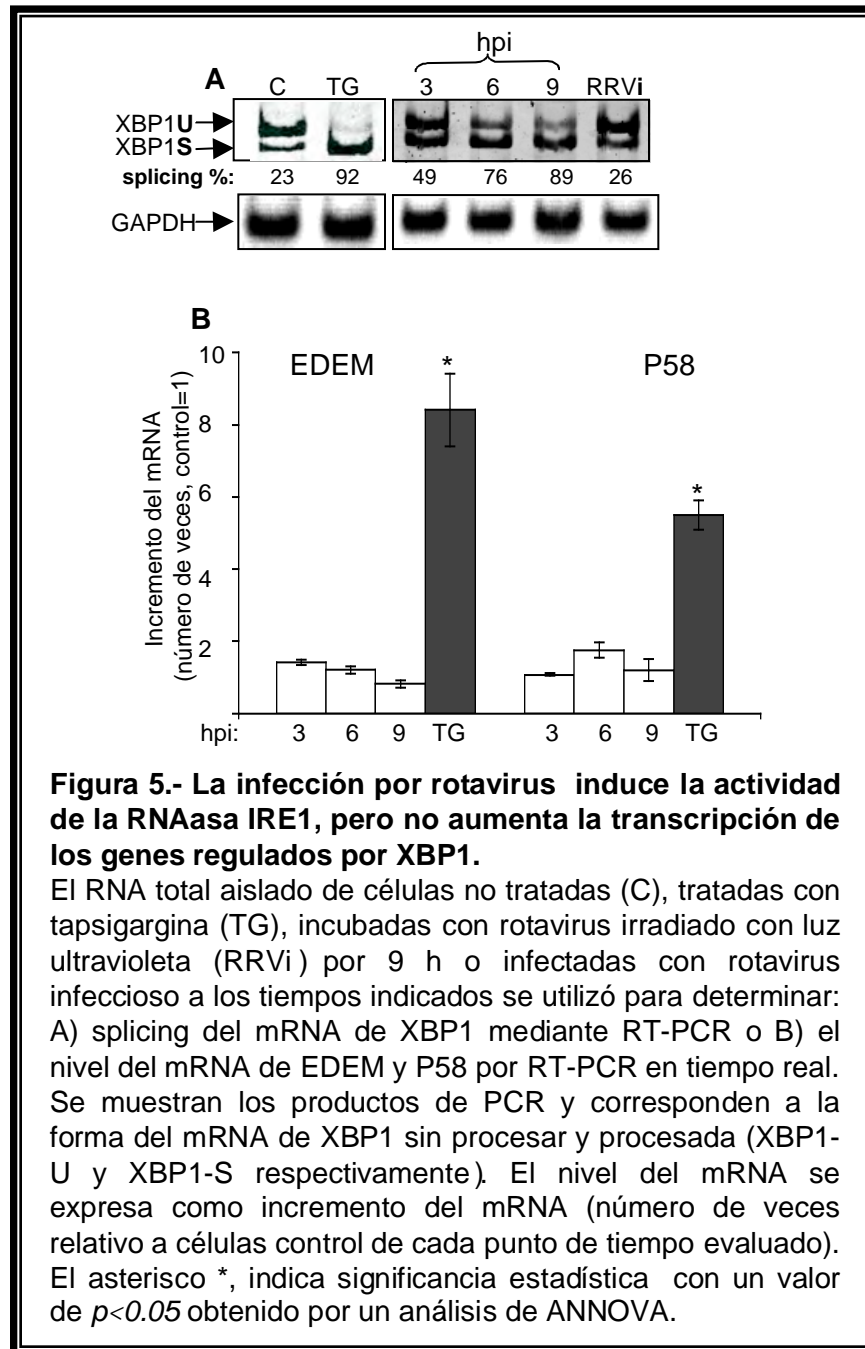
La infección por rotavirus induce la actividad de IRE1, pero no aumenta la transcripción de los genes regulados por XBP1.

Parte de los resultados que se describen a continuación se publicaron en el Journal of Virology. El artículo se incluye en el anexo 2. Además durante mi estancia en el laboratorio participe en la escritura de un artículo de revisión, el cual se incluye en el anexo 3.

Con la finalidad de saber si rotavirus inducía la actividad de endonucleasa de IRE1, se analizó si ocurría el splicing del pre-RNA de XBP1 en células infectadas por rotavirus cosechadas a diferentes tiempos después de la infección. Además, con el fin de evaluar si la entrada de rotavirus a la célula inducía la actividad de IRE1 en el análisis se incluyó el uso de rotavirus irradiado con luz ultravioleta (RRVi), el cual tiene la habilidad de unirse y entrar a la célula pero es incapaz de iniciar la replicación viral. El uso de un par de oligonucleótidos que flanquean el sitio de splicing del mRNA de XBP1 permitió sintetizar y amplificar por RT-PCR dos productos correspondientes a la forma no procesada y procesada de XBP1 (XBP1-U y XBP1-S respectivamente) y mediante un análisis densitométrico de la señal obtenida de los productos de PCR se calculó el porcentaje de splicing, utilizando la siguiente fórmula: $\% \text{ splicing} = \frac{\text{XBP1-S}}{\text{XBP1-U} + \text{XBP1-S}} (100)$. Como puede observarse en la fig 5A, en células sin tratamiento se detecta una cantidad pequeña de mRNA de XBP1 procesado (20% de splicing), lo cual indicó que IRE1 es muy sensible y que su actividad puede iniciarse

simplemente por la manipulación de las células durante el experimento. Sin embargo se nota que el transcrito de XBP1 no procesado (XBP1-U) es la forma más abundante en células sin tratamiento. En contraste, en células tratadas con taspigargina el transcrito de XBP1 más abundante es la forma procesada (XBP1-S), lo que representa aproximadamente un 90 % del procesamiento del mRNA de XBP1. En células infectadas por rotavirus, se observó una acumulación progresiva en la cantidad del mRNA de XBP1 procesado, la cual es dependiente del tiempo de infección, mientras que en células incubadas con RRVi por 9 h se observa un 25% del procesamiento del mRNA de XBP1. Debido a que este cambio es similar al encontrado en células sin tratamiento, esta observación sugirió que la entrada de rotavirus a la célula per se no induce la actividad de IRE1 y por lo tanto se necesita la replicación del virus para que ocurra el splicing del mRNA de XBP1 (Figura 5A). Con el propósito de continuar con la caracterización de la vía de IRE1, se analizó por RT-PCR en tiempo real el nivel del mRNA de EDEM y P58, dos genes que se regulan por XBP1. La figura 5B muestra que no se modificaron los niveles de estos dos mensajeros a lo largo de la cinética de infección con rotavirus. Sin embargo, como se esperaba, el tratamiento con taspigargina dió lugar a un incremento significativo de 8 y 5 veces en el nivel del mRNA de EDEM y P58 respectivamente. Los resultados mostrados en conjunto permiten sugerir que la infección por rotavirus induce la actividad de endorribonucleasa de IRE1 que procesa al mRNA de XBP1, pero no aumenta la transcripción de los genes regulados por XBP1, sugiriendo que como ocurre durante

la infección con otros virus como el citomegalovirus humano (CMVH) y el virus de la hepatitis C (VHC) [72-73], rotavirus podría inhibir la traducción del mRNA de XBP1 procesado o bien suprimir la actividad transcripcional de XBP1.



La infección por rotavirus activa la vía de ATF6, pero impide la expresión de sus genes blanco.

El siguiente objetivo del trabajo consistió en monitorear la activación y la actividad transcripcional de ATF6, en células infectadas por rotavirus. Para ello, se transfectaron células MA104 con el plásmido 5XATF6-luc o GRP78-luc, el primero tiene cinco veces repetida la secuencia de DNA que reconoce la proteína ATF6 activa, mientras que el segundo plásmido posee la región promotora del gen GRP78. Ambas secuencias están fusionadas a la región codificante de la luciferasa de luciérnaga. Después de 24 h de transfección, las células se infectaron y cosecharon a distintos tiempos post-infección o después del tratamiento con taspigargina. La actividad de luciferasa manejada por la secuencia de reconocimiento de ATF6 o por el promotor de GRP78 permaneció sin cambio a lo largo de la cinética de infección con rotavirus, lo que sugiere que durante la infección por rotavirus no se activa la vía de ATF6 o bien al igual que con XBP1, rotavirus es capaz de bloquear la actividad transcripcional de ATF6. En contraste, el tratamiento con taspigargina causó un aumento significativo en la actividad de luciferasa (Figura 6A).

Con el fin de verificar la infección de las células transfectadas, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para detectar a la proteína no estructural NSP5, un marcador de viroplasma. La figura 6B muestra la presencia de viroplasma tanto en células únicamente infectadas como en células transfectadas e infectadas con

rotavirus, sugiriendo que la transfección de los plásmidos en células MA104 no interfiere con la replicación de rotavirus (Figura 6B).

Posteriormente, con el propósito de confirmar los resultados obtenidos con los plásmidos 5XATF6-luc y GRP78-luc, se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real, el nivel del mRNA de luciferasa en células transfectadas e infectadas por 9 h con rotavirus. También, el nivel del mRNA de GRP78 endógeno se determinó en células únicamente infectadas con rotavirus. Como se observa en la figura 6C, tanto el tratamiento con la taspigargina como la infección por rotavirus aumentaron significativamente el nivel del mRNA de luciferasa en células transfectadas con 5XATF6-luc o con GRP78-luc, esto con respecto a células control. De forma similar, el nivel del mRNA de GRP78 endógeno aumentó significativamente en respuesta a la infección por rotavirus o al tratamiento con taspigargina (Figura 6C). Estos datos permiten sugerir que la infección por rotavirus induce la proteólisis del precursor de ATF6, el cual una vez activo se transloca al núcleo para promover la transcripción del gen reportero, pero la traducción del mRNA o la actividad de la luciferasa es posteriormente inhibida por el virus.

Para saber a que nivel se encontraba la inhibición, se determinó por inmunoblot la presencia de luciferasa en lisados de células transfectadas con 5XATF6-luc e infectadas por 9 h con rotavirus. Como puede observarse en la figura 6D, el tratamiento con taspigargina indujo la expresión de la luciferasa con respecto a células control, mientras que en células infectadas con rotavirus no se detectó la

enzima, indicando que la falta de actividad de la luciferasa coincide con la falta de expresión de la enzima.

En conjunto, los datos arriba descritos apoyan la hipótesis de que la falta de actividad de luciferasa en las células transfectadas con 5XATF6-luc o GRP78-luc se debe a una inhibición en la expresión de la luciferasa mediada por rotavirus, más que a una inhibición de la actividad de esta enzima.

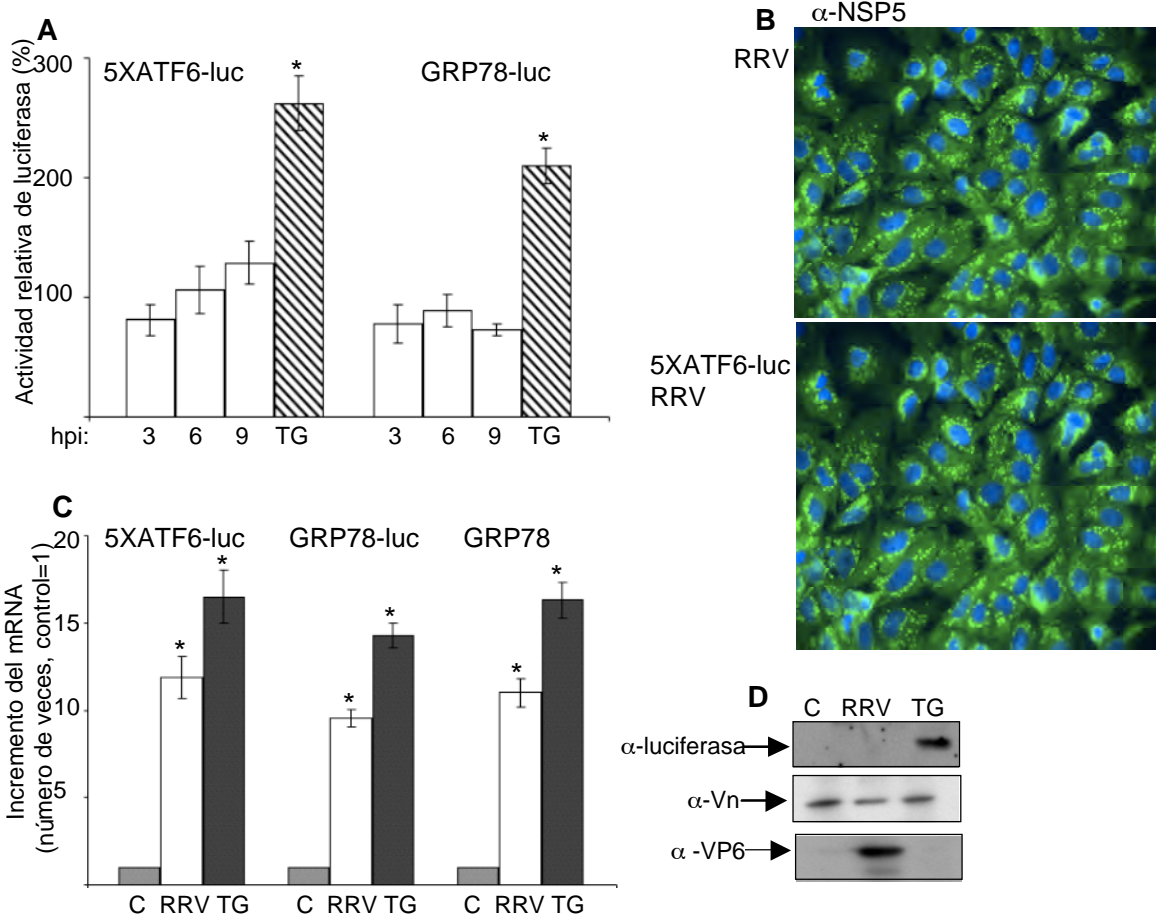


Figura 6. La infección por rotavirus induce la activación de ATF6 pero impide la expresión de sus genes blanco.

A) Células MA104 transfectadas con el plásmido 5XATF6-luc o GRP78-luc se infectaron con rotavirus durante los tiempos indicados o se trataron con taspigargina (TG). La actividad de luciferasa se expresa en porcentaje, considerando como el 100% el valor obtenido en células no infectadas. B) Inmunofluorescencia en células MA104 infectadas con rotavirus o bien transfectadas con el plásmido 5XATF6-luc e infectadas con rotavirus por 9 h para detectar a la proteína NSP5, un marcador de viroplasmas y los núcleos se tiñeron con dapi. C) RNA total se extrajo de células transfectadas con los plásmidos 5XATF6-luc o GRP78-luc e infectadas con rotavirus durante 9 h o se trataron con taspigargina, para determinar el nivel del mRNA de la luciferasa de luciérnaga o GRP78, el cual se normalizó con el mRNA de la luciferasa de Renilla o GAPDH respectivamente. Los resultados se expresan como incremento del mRNA (número de veces relativo a células control no infectadas). El asterisco *, indica significancia estadística con un valor de $p < 0.05$ obtenido por un análisis de ANNOVA. D) Inmunoblot de lisados de células transfectadas con 5XATF6-luc e infectadas con rotavirus y teñidos con anticuerpo anti-luciferasa. El blot también se tiño con anti-vimentina como control de carga y con anti-rotavirus para mostrar la presencia de proteínas virales.

La infección por rotavirus no aumenta la traducción selectiva de ATF4, pero induce la transcripción de CHOP y GADD34.

Dado que en respuesta al estrés del RE la fosforilación de eIF2 α da lugar a la traducción selectiva del factor transcripcional ATF4, el cual promueve la transcripción de varios genes incluyendo el factor transcripcional CHOP, otro de los objetivos del trabajo consistió en la determinación de la traducción y la actividad transcripcional de ATF4 en células infectadas por rotavirus. Ésto se llevo a cabo mediante la transfección de células MA104 con el reportero traduccional mUTR-ATF4-luc, que tiene la región 5' no traducida del mRNA de ATF4 murino, la cual está implicada en su regulación traduccional dependiente de la fosforilación del factor eIF2 α o con el reportero transcripcional CHOP-luc, que tiene la región promotora del gen CHOP. Ambas secuencias están fusionadas a la región codificante de la luciferasa de luciérnaga. Las células se cosecharon a distintos tiempos post-infección (hpi) y se determinó la actividad de luciferasa en los lisados celulares.

Como se observa en la figura 7A, la actividad de luciferasa presente con cualquiera de los dos reporteros utilizados (mUTR-ATF4-luc o CHOP-luc) permaneció sin cambio a lo largo de la cinética de infección, mientras que en el tratamiento con taspigargina aumentó significativamente la actividad de luciferasa comparado con las células control sin tratamiento. Estos resultados indicaron que aún cuando la fosforilación del factor eIF2 α se mantiene a lo largo del ciclo replicativo de rotavirus,

la traducción de ATF4 y por tanto la transcripción de CHOP no se induce durante la infección con rotavirus.

Para confirmar los resultados obtenidos con los plásmidos reporteros, se determinó el nivel del mRNA endógeno de CHOP y GADD34, dos genes que pueden ser regulados por ATF4 mediante RT-PCR en tiempo real. Interesantemente y contrario a lo observado con los plásmidos reporteros, observamos que la infección incrementó de manera gradual y significativa el nivel de ambos mensajeros celulares, lo cual como puede observarse en la figura 7B, es dependiente del tiempo de infección. Como se esperaba, el tratamiento con taspigargina incrementó significativamente el nivel de los dos mensajeros examinados. En resumen, los resultados previamente descritos indicaron una falta de correlación entre los datos obtenidos con los plásmidos reporteros de la luciferasa y el análisis de los mRNAs endógenos por RT-PCR en tiempo real, la cual sugirió la posibilidad de que la expresión de luciferasa promovida por el UTR del mRNA de ATF4 y el promotor del gen CHOP podría ser inhibida por rotavirus similar a lo observado con los reporteros 5XATF6-luc y GRP78-luc (Figura 6A).

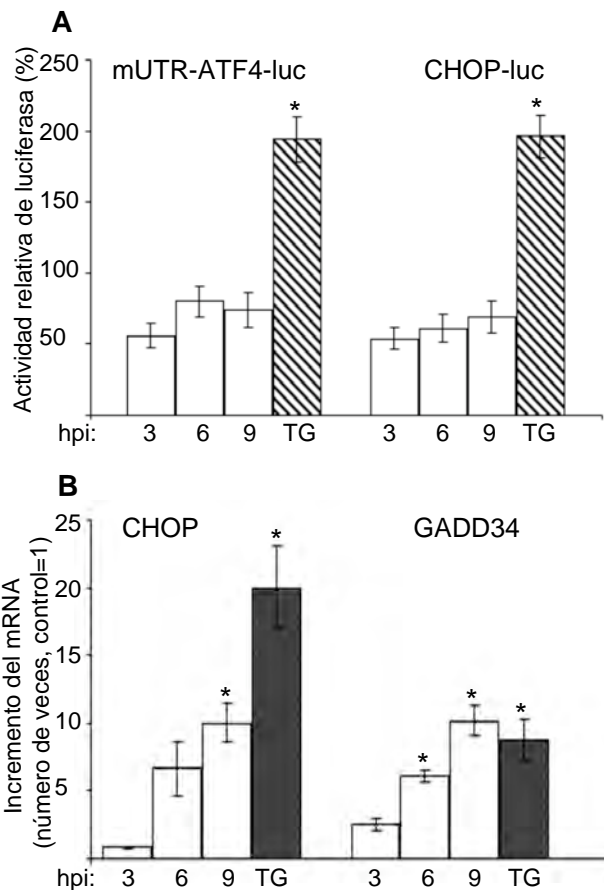


Figura 7. La infección por rotavirus no aumenta la traducción de ATF4, pero induce la transcripción de GADD34 y CHOP.

A) Células MA104 transfectadas con el plásmido mUTR-ATF4-luc o CHOP-luc se infectaron por rotavirus o se trataron con tapsigargina (TG). A los tiempos indicados, las células se cosecharon para determinar la actividad de luciferasa. Los datos se expresan en porcentaje relativo al valor obtenido en células sin infectar, el cual se considera como el 100%. B) RNA total aislado de células infectadas o tratadas con tapsigargina se analizó por RT-PCR en tiempo real utilizando primers específicos para la detección de los mRNAs de GADD34 o de CHOP, los cuales se normalizaron con el nivel del mRNA de GADPH. Los datos se expresan como incremento del mRNA (número de veces relativo a células control de cada punto de tiempo evaluado). El asterisco *, indica significancia estadística con un valor de $p < 0.05$ obtenido por un análisis de ANNOVA.

Hasta este punto, el análisis de los tres componentes de la UPR en células infectadas por rotavirus mostró que este virus induce la actividad de endorribonucleasa de IRE1, incrementa en el nivel de los mRNAs de GRP78, CHOP y GADD34, lo cual sugirió que rotavirus induce una UPR. Sin embargo, la falta de activación transcripcional de los genes regulados por XBP1, así como la ausencia de la actividad de luciferasa promovida por ATF6 o el UTR del mRNA de ATF4 o el promotor de los genes GRP78 y CHOP, sugirió una modulación de la respuesta. El hecho de que la infección por rotavirus indujera la transcripción pero no la expresión y en consecuencia la actividad de la luciferasa promovida por ATF6 o el promotor de GRP78, llevo a pensar que la inhibición podría ocurrir a nivel traduccional.

Debido a que en un estudio previo se demostró que la expresión de los plásmidos reporteros utilizados en el presente trabajo, ocurría en condiciones en las que el factor eIF2 α se encuentra fosforilado [74] y que en el caso de células infectadas por rotavirus, la inhibición de la síntesis de proteína celular está mediada por la fosforilación del factor eIF2 α y por la proteína no estructural NSP3 [64], quedaba por investigar el papel de esta proteína viral en la expresión de la luciferasa promovida por los elementos de respuesta al estrés del RE, así como en la expresión de XBP1.

La proteína viral NSP3 inhibe la traducción de los genes regulados por el estrés del RE durante la infección por rotavirus.

En base a las evidencias antes mencionadas y con la finalidad de evaluar el papel de NSP3 en la modulación de la UPR, se utilizó la técnica de RNA de

interferencia (RNAi) para silenciar la expresión de NSP3 y en estas condiciones se analizó otra vez la actividad de luciferasa promovida por los elementos de respuesta al estrés del RE y el nivel del mRNA de los genes regulados por XBP1. Para ello, células MA104 se cotransfectaron por 24 h con cada uno de los plásmidos reporteros junto con un siRNA específico para NSP3, o bien con un siRNA no relacionado (IRR) como control negativo. Las células se cosecharon 9 h después de la infección y en los lisados celulares se examinó la expresión de NSP3 a través de un inmunoblot (Inserto en la figura 8A). Una vez confirmado el silenciamiento de NSP3, se determinó la actividad de luciferasa en cada condición experimental.

Con la excepción del reportero traduccional mUTR-ATF4-luc y en comparación con células transfectadas con un siRNA no relacionado, encontramos que la ausencia de NSP3 permitió que la infección con rotavirus aumentara significativamente la actividad de luciferasa de los plásmidos; 5XATF6-luc, GRP78-luc, y CHOP-luc (Figura 8A). Como previamente se observó, el tratamiento con taspargina incremento de manera significativa la actividad de luciferasa. Estas observaciones nos permiten sugerir que la proteína no estructural NSP3 está involucrada en la inhibición de la expresión de la luciferasa promovida por los elementos de respuesta al estrés del RE. Dado que el mecanismo traduccional selectivo utilizado por ATF4 no se regula por NSP3, es posible que otra (s) proteínas virales aún desconocidas estén involucradas.

Para estudiar si la falta de activación transcripcional de los genes que son regulados por XBP1 se debe a una inhibición de su expresión mediada por NSP3, se

analizó el nivel del mRNA de EDEM y P58 en ausencia de NSP3 incluyendo también en el análisis el mRNA de XBP1 e IRE1, ya que XBP1 se regula por el estrés del RE mientras que IRE1 se uso como control negativo.

Como se esperaba, el nivel del mRNA de IRE1 no se modificó por el tratamiento con taspigargina o por la infección con rotavirus (Figura 8B). En contraste y en comparación con células transfectadas con un siRNA no relacionado, en células transfectadas con el siRNA dirigido contra NSP3, la infección por rotavirus indujo un aumento significativo de 4, 2, y 4 veces en el nivel de los mRNAs de XBP1, EDEM y P58, respectivamente. De acuerdo a lo previamente observado, el tratamiento con taspigargina también aumentó significativamente el nivel de los tres mensajeros celulares evaluados (Figura 8B). El hecho de que en células donde la expresión de NSP3 se encuentra silenciada se observe la activación transcripcional de XBP1 y sus genes blanco permite sugerir que NSP3 está también implicada en la regulación del factor transcripcional XBP1.

En cuanto al mecanismo de traducción selectiva utilizado por ATF4, éste no ocurre en células infectadas por rotavirus o bien éste mecanismo es regulado por una proteína diferente a NSP3. Otra posibilidad es que la fosforilación de eIF2 α no sea el único requerimiento para que la traducción selectiva de esta proteína se lleve a cabo.

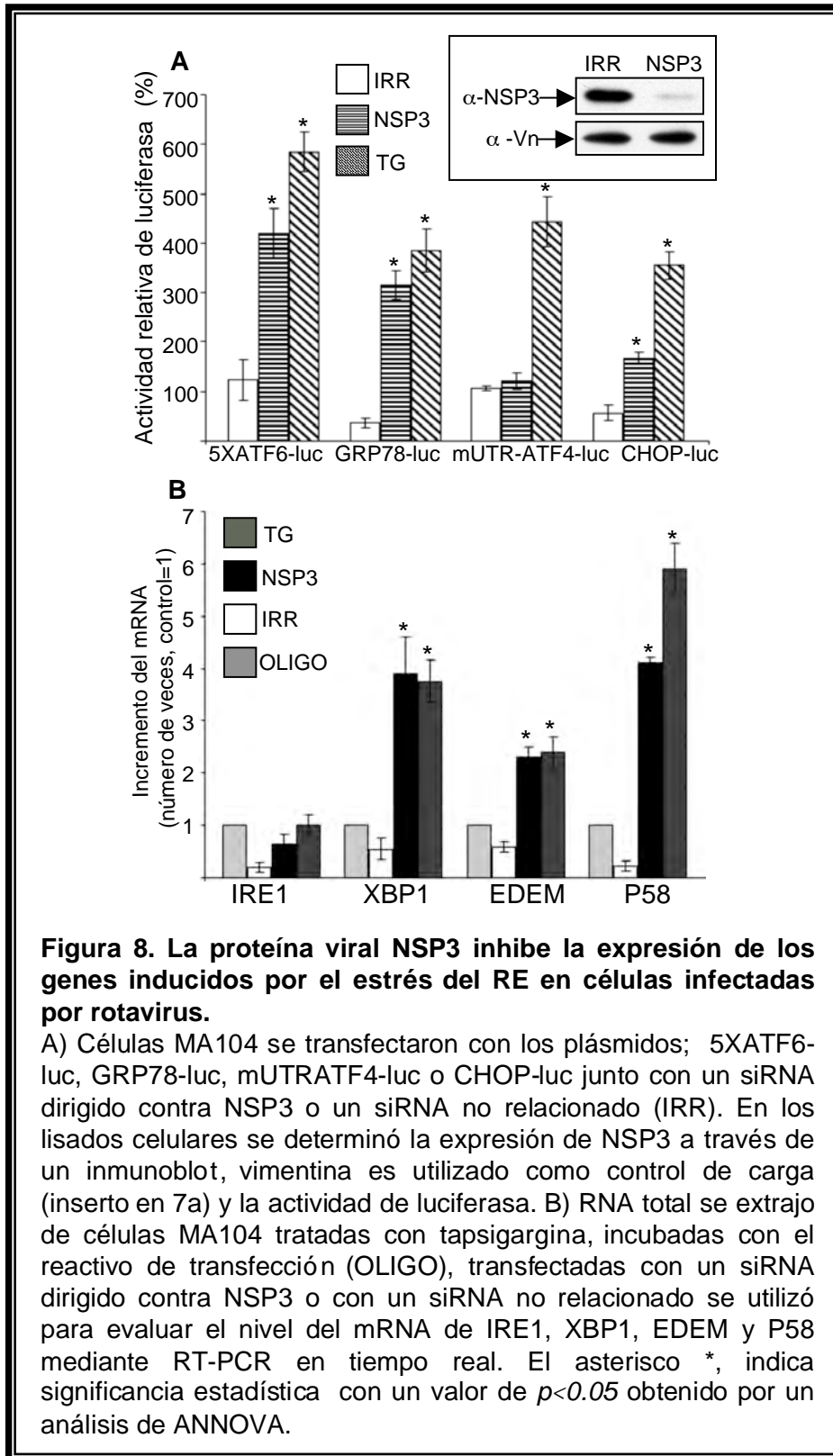


Figura 8. La proteína viral NSP3 inhibe la expresión de los genes inducidos por el estrés del RE en células infectadas por rotavirus.

A) Células MA104 se transfectaron con los plásmidos; 5XATF6-luc, GRP78-luc, mUTRATF4-luc o CHOP-luc junto con un siRNA dirigido contra NSP3 o un siRNA no relacionado (IRR). En los lisados celulares se determinó la expresión de NSP3 a través de un inmunoblot, vimentina es utilizado como control de carga (inserto en 7a) y la actividad de luciferasa. B) RNA total se extrajo de células MA104 tratadas con tapsigargina, incubadas con el reactivo de transfección (OLIGO), transfectadas con un siRNA dirigido contra NSP3 o con un siRNA no relacionado se utilizó para evaluar el nivel del mRNA de IRE1, XBP1, EDEM y P58 mediante RT-PCR en tiempo real. El asterisco *, indica significancia estadística con un valor de $p < 0.05$ obtenido por un análisis de ANNOVA.

El RNA de doble cadena no induce estrés del RE en células MA104.

Inicialmente se describió que la cinasa PKR se activa por RNA de doble cadena (dcRNA) producido durante la transcripción o replicación viral. Más recientemente se demostró que PKR se activa por otras condiciones de estrés, incluyendo el tratamiento con fármacos inductores de estrés del RE como la taspigargina, un inhibidor de la ATPasa del RE [75]. La presencia de dcRNA en células infectadas por rotavirus, indica que este RNA es el activador de la cinasa PKR [76], sin embargo se desconoce si esta cinasa o su activador, el dcRNA representa un estímulo o contribuye a la generación de estrés del RE en células MA104.

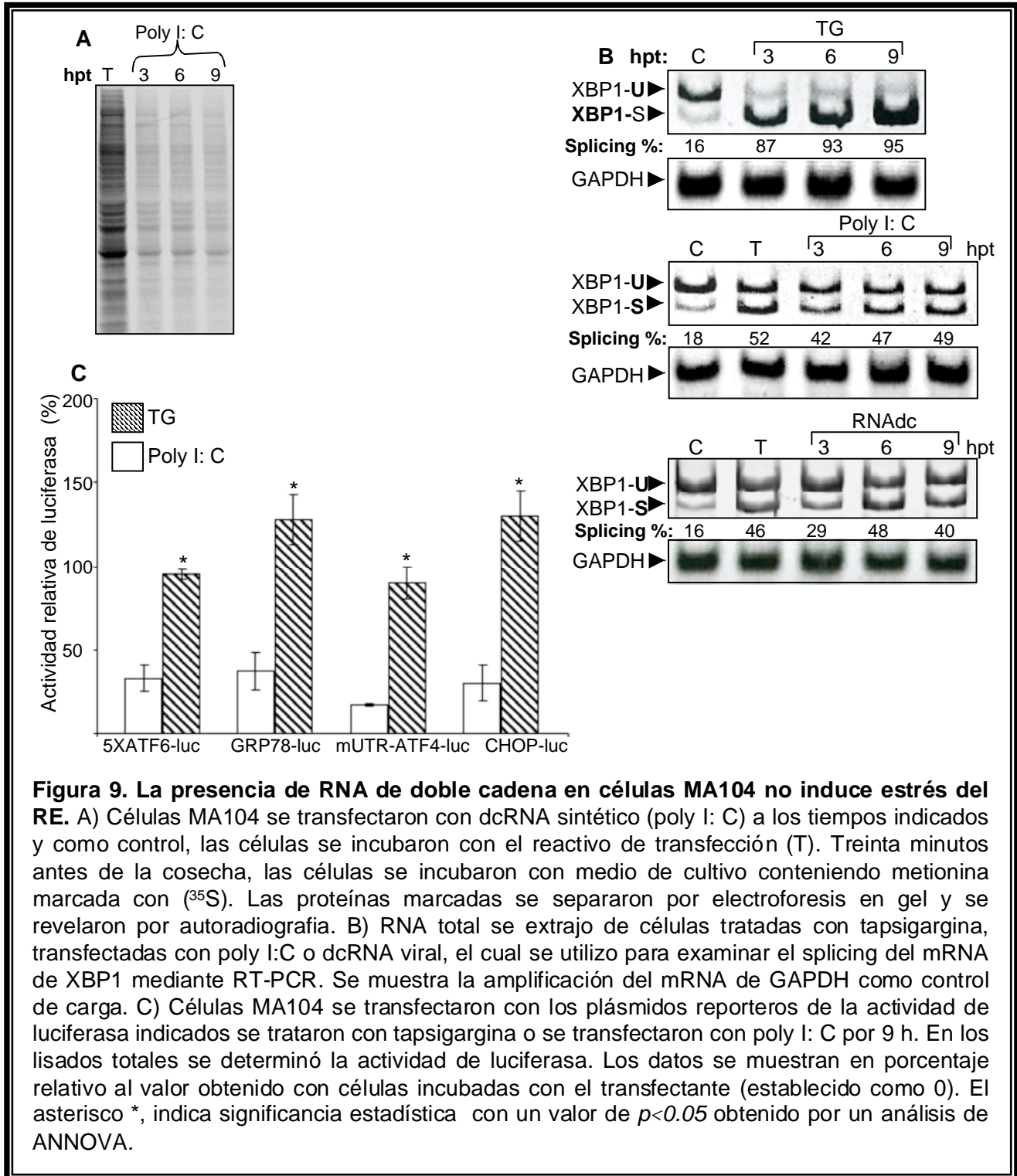
Con el propósito de evaluar la participación del dcRNA y la actividad de PRK en la UPR, se analizó el splicing del mRNA de XBP1 en células transfectadas con poly I: C, un dcRNA sintético. El efecto de la transfección de dcRNA se examinó a través de un marcaje metabólico 30 min antes de la lisis celular. Como puede observarse en la figura 9A, comparado con células incubadas únicamente con el transfectante, la transfección del dcRNA causó la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, indicativo de la activación de la cinasa PKR y de la fosforilación de eIF2 α . Con respecto al procesamiento del mRNA de XBP1, la fig 9B muestra que mientras el tratamiento con taspigargina aumentó progresivamente la cantidad del mRNA procesado de XBP1, en células transfectadas con el dcRNA sintético o viral el procesamiento del mRNA de XBP1 es similar al observado en células únicamente

incubadas con el transfectante. Éstos datos permiten sugerir que la lipofección de dcRNA en células MA104 no dió lugar al procesamiento del mRNA de XBP1.

Con la finalidad de evaluar el resto de los componentes de la UPR, se analizó la actividad de luciferasa en células transfectadas con el dcRNA y los plásmidos; 5XATF6-luc, GRP78-luc, mUTR-ATF4-luc y CHOP-luc. El análisis se realizó a las 3, 6 y 9 h después de la transfección (hpt), pero sólo se muestran los datos obtenidos a las 9 hpt ya que a tiempos más tempranos los resultados son similares. Como se muestra en la figura 9C, la actividad de luciferasa manejada por cualquiera de los elementos de respuesta al estrés del RE no se modificó en presencia del dcRNA. Como se esperaba y se había observado previamente, el tratamiento con taspigargina aumentó significativamente la actividad de luciferasa. Se obtuvieron resultados similares al utilizar dcRNA viral purificado (resultados no mostrados).

En conjunto, estos datos indican que la actividad de PKR, inducida por el dcRNA no causa estrés del RE en las células MA104. Interesantemente, similar a la infección con rotavirus, la expresión de reportero traduccional m-UTR-ATF4-luc tampoco se indujo por la transfección de dcRNA, lo cual apoya la hipótesis de que la fosforilación de eIF2 α podría no ser el único requerimiento para que se lleve a cabo la traducción de ATF4 y posiblemente la actividad de PERK se necesita, ya que esta cinasa se ha relacionado más ampliamente con la traducción de ATF4 [77]. Además, esta posibilidad es consistente con el hecho de que en ambas condiciones tanto de la

infección, como la de lipofección del dcRNA, la cinasa activa es PKR y la traducción de ATF4 no se induce.



Estudios previos mostraron que durante la infección viral mas de una de las cinasas del factor eIF2 α puede activarse. Por ejemplo la infección por el enterovirus-71 activa a las cinasas PKR y PERK mientras que el virus causante de la estomatitis vesicular activa a las cinasas GCN2, PERK y PKR [78-79]. En el caso de células infectadas por rotavirus, conocemos que PKR es la cinasa que fosforila al factor eIF2 α pero se desconoce si otras cinasas se activan en la infección por rotavirus.

Por otro lado, el hecho de que la infección con rotavirus en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) carentes de la actividad de cinasa de PERK (PERK $^{-/-}$) diera lugar a una producción mayor de progenie viral, comparada con los MEFs silvestres, sugirió que PERK no sólo se activa por rotavirus sino que también esta cinasa contribuye a la resistencia celular contra la infección por este virus (Rojas, M. Resultados no publicados). Ésta observación llevo a pensar que la activación de PERK podría ocurrir a tiempos tempranos de la infección con rotavirus y dado que la actividad de esta cinasa parece ser necesaria para que el mecanismo traduccional selectivo se lleve a cabo, decidimos analizar la actividad de luciferasa en células transfectadas con el reportero traduccional mUTR-ATF4-luc en períodos de tiempo de 1 h empezando desde la adsorción del virus a la célula hasta 3 h después de la infección. Como puede observarse en la figura 10A, la adsorción del virus a la célula aumento aproximadamente un 70% la actividad de luciferasa promovida por el UTR del mRNA de ATF4, la cual disminuye rápidamente después de 1 h de la infección. Esta observación nos permite sugerir que la traducción de ATF4 se induce de manera

rápida y transitoria durante la adsorción del virus a la célula, período en el cual rotavirus se une y entra a la célula huésped. Con el fin de verificar esta observación, utilizamos virus irradiado (RRVi) con luz ultravioleta (UV) y además probamos el efecto de la transfección de partículas de rotavirus de doble capa (DLPs) o el dcRNA viral. Todas estas condiciones se probaron por 9 h en células MA104 y se compararon con el control, que en este caso fue la incubación de células con un lisado de células no infectadas irradiado con luz ultravioleta, o bien células incubadas únicamente con el reactivo de transfección. Como puede observarse en la figura 10B, la infección con rotavirus, la transfección de DLPs o el dcRNA no modificaron la actividad de luciferasa en células transfectadas con el plásmido mUTR-ATF4-luc mientras que la incubación de las células con el virus irradiado (RRVi) causó un aumento del 80% en la actividad de luciferasa. Esta observación nos permite sugerir que la traducción de ATF4 se induce de manera rápida y transitoria durante el proceso de unión y/o entrada de rotavirus a la célula huésped, ya que el virus irradiado con luz UV se une y entra a la célula, pero no se replica. La observación de que el incremento en la actividad de luciferasa se mantenga por 9 h en el caso de la incubación de las células con el virus irradiado pero no con el virus infeccioso apoya la hipótesis de que el mecanismo de traducción selectivo a través del cual se traduce ATF4 también depende de la regulación por algún producto viral, sin embargo se necesitan realizar experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

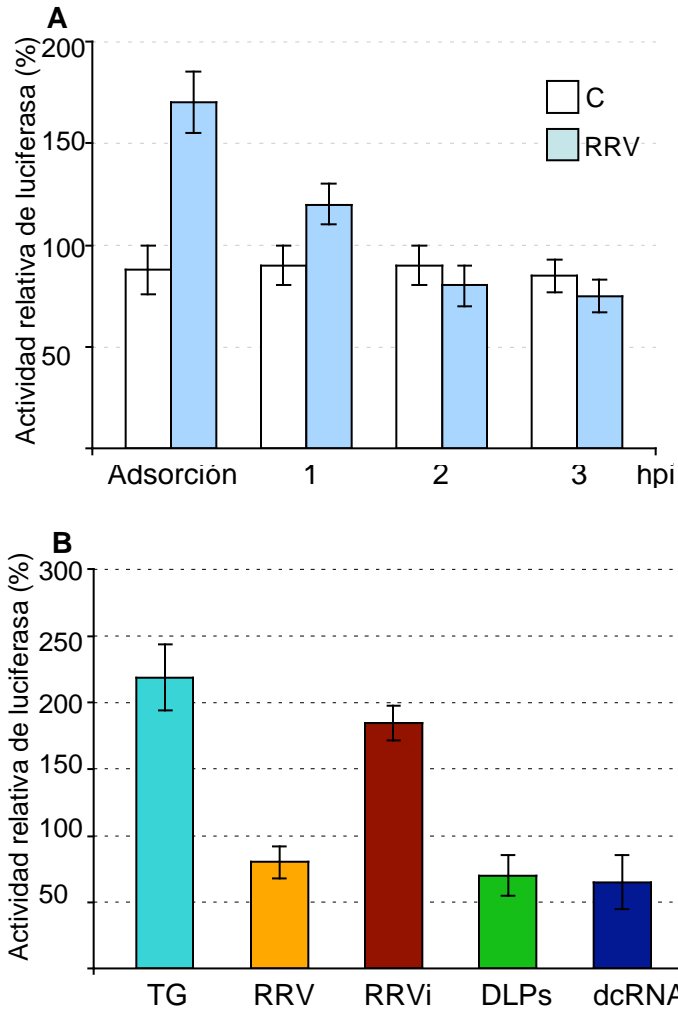


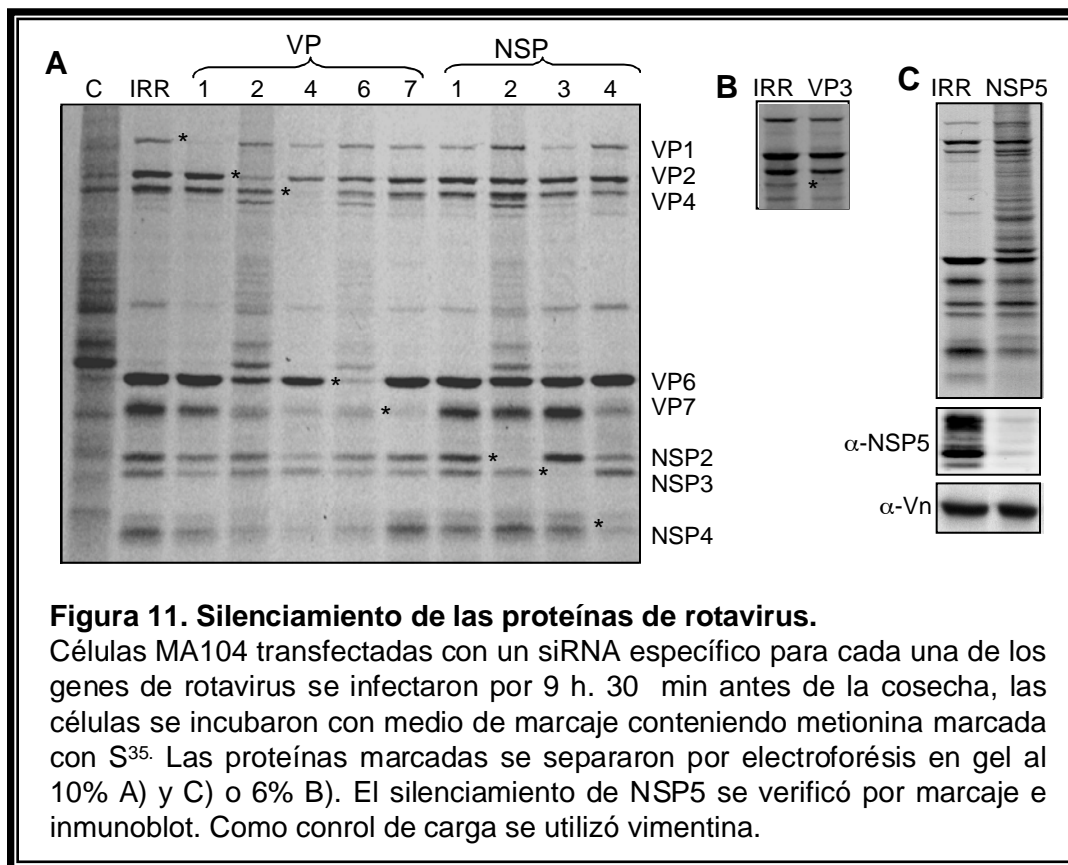
Figura 10. La traducción de ATF4 se induce rápida y transitoriamente durante la adsorción de rotavirus a células MA104.

A) Células MA104 transfectadas con el reportero traduccional mUTR-ATF4-luc se infectaron con rotavirus y a los tiempos indicados se cosecharon y se determinó la actividad de la luciferasa, la cual se comparó con células control incubadas con un lisado de células no infectadas (C). B) Células MA104 transfectadas con el reportero traduccional mUTR-ATF4-luc se trataron con tapsigargina (TG), infectaron con rotavirus infeccioso, incubaron con RRV irradiado con luz UV (RRVi) o bien se transfectaron con DLPs o el dcRNA viral por 9 h. La actividad de la luciferasa en cada condición es relativa a su control respectivo (100%).

Varios eventos del ciclo infeccioso de rotavirus causan estrés de RE en células infectadas.

Finalmente, caracterizamos la contribución de cada una de las proteínas virales, en la inducción de UPR. Para ello, se silenció la expresión de cada uno de los genes rotavirales mediante RNA de interferencia. Como se observa en la figura 11A, B y C, el silenciamiento de las proteínas virales fue muy eficiente. Con un asterisco se indica la posición de la proteína cuya expresión está reducida o ausente. El silenciamiento de NSP5 se examinó mediante inmunoblot (Figura 11C, parte inferior), mientras que la disminución en la expresión de NSP1 se verificó mediante el análisis de la cantidad del mRNA por RT-PCR en tiempo real.

Una vez confirmada, la inhibición parcial o total de cada una de las proteínas virales, se procedió a analizar mediante RT-PCR el procesamiento del mRNA de XBP1 y el nivel de expresión del mRNA de GRP78, dos de los marcadores de UPR.

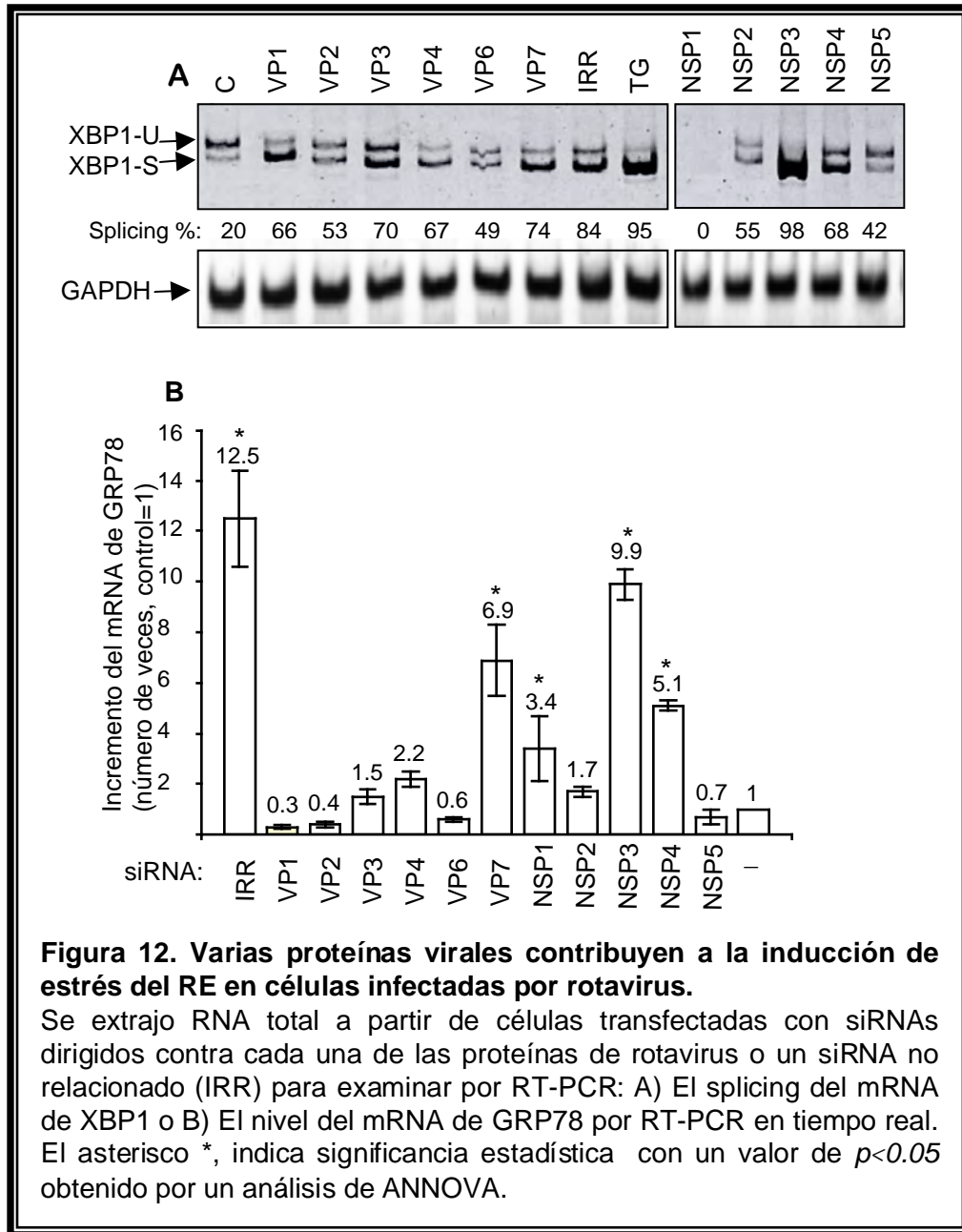


Como habíamos descrito previamente, en células transfectadas un siRNA no relacionado (IRR) e infectadas por rotavirus observamos una acumulación del mRNA procesado de XBP1 mientras que el silenciamiento de las proteínas virales afecto en diferente grado el procesamiento del mRNA de XBP1 (figura 12A). En células donde se silenciaron las proteínas VP2, VP6, NSP2 o NSP5 se observaron niveles similares del transcrito procesado de XBP1. Cuando se silenció a las proteínas; VP1, VP3, VP7 o NSP4 se observó una acumulación mayor del transcrito procesado de XBP1. En células donde se silenció NSP3 se observó una acumulación del transcrito procesado de XBP1 mayor a la observada en células únicamente infectadas con rotavirus y similar a la observada en células tratadas con taspigargina. Cabe mencionar, que

además de un mayor procesamiento del mRNA de XBP1, se observa un incremento en la cantidad del transcrito procesado, lo cual es consistente con el aumento en la acumulación del transcrito de XBP1 observado en esta condición (Figura 8B).

Interesantemente y de manera inesperada, encontramos que al silenciar NSP1, ninguno de los transcritos de XBP1 se amplificó, aunque desconocemos la causa, este efecto se reprodujo en al menos tres experimentos independientes.

En cuanto al nivel del mRNA de GRP78, como previamente se había observado y con respecto a células no infectadas, la infección con rotavirus indujo un aumento de 10 veces el nivel de expresión del mRNA de GRP78 (Figura 12B). El silenciamiento de las proteínas virales afectó en distinto grado el nivel del mRNA de GRP78 inducido por rotavirus. En comparación con las células transfectadas con un siRNA no relacionado (IRR), la ausencia de VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2 o NSP5 dió lugar a una reducción muy severa en la cantidad del mRNA de GRP78, la cual es similar a la observada en las células no infectadas. Por otra parte, el silenciamiento de VP4, VP7, NSP1, NSP3 y NSP4 redujo en menor grado el nivel del mRNA de GRP78 inducida por la infección. En resumen, el uso de siRNAs dirigidos contra cada una de las proteínas del genoma de rotavirus permitió conocer el grado de estrés inducido por cada uno de los eventos del ciclo replicativo de este virus, los cuales en conjunto determinan la magnitud total de la respuesta de UPR en la célula infectada.



VIII. DISCUSIÓN

La habilidad de los virus para modular o sobrepasar los mecanismos de defensa celular generalmente está asociada con la capacidad replicativa de los virus y por lo tanto con el tipo de infección establecida. En el caso de la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR, la evidencia experimental hasta ahora descrita permite sugerir que esta respuesta funciona como un mecanismo de defensa celular contra la infección viral por su capacidad intrínseca de modificar la actividad biosintética de la célula. Si bien esta respuesta mantiene la supervivencia celular al impedir una acumulación tóxica de proteínas mal plegadas, este mecanismo celular eventualmente también induce muerte cuando el daño celular es irreparable, o sostenido.

Se ha demostrado que el efecto citopático causado por la infección del virus de la encefalitis Japonesa (JEV), o el virus dengue (DEN-2) está relacionado con la UPR, ya que células poco permisivas a la infección por estos virus no muestran cambios en la expresión de los marcadores de estrés del RE [23]. En un trabajo previamente reportado por nuestro grupo se encontró que la ausencia de NSP3 causa un retraso en el efecto citopático producido por rotavirus, sin embargo, en ese momento se desconocía la razón [80]. Los datos del presente estudio muestran que rotavirus a través de NSP3 interrumpe la señalización de dos vías de la UPR, una respuesta que mantiene la supervivencia de la célula al corregir el defecto en el plegamiento de proteínas en el RE de acuerdo a la demanda impuesta por la infección. Consistente con estas funciones de la UPR, además de una mayor

supervivencia de las células en las que se silenció NSP3, también se describió un incremento en la transcripción y replicación del genoma de rotavirus, lo cual correlacionó con una producción mayor de virus infeccioso [80]. Cabe también mencionar que una reducción en la expresión de chaperonas como GRP78, PDI, calnexina y calreticulina mediante RNAi dió lugar a una reducción en la producción de progenie viral infecciosa de rotavirus, indicando que las chaperonas residentes del RE podrían participar en el plegamiento de proteínas virales [63]. Por lo tanto, en el caso de rotavirus también existe una relación entre la expresión de las chaperonas residentes del RE y el efecto citopático producido. Se conoce que tanto la proteína ATF6 como XBP1 están también involucradas en la biogénesis del RE [27-28] Dado que el silenciamiento de NSP3 permitió que durante la infección se activara la transcripción de los genes regulados por ATF6 y XBP1, es posible que no sólo el plegamiento de las proteínas sino también el tamaño del RE se incremente en ausencia de NSP3, lo que favorecería la morfogénesis de las partículas virales.

XBP1 es un factor transcripcional que regula la transcripción de múltiples genes, algunos de los cuales son específicos del tipo celular [81]. Recientemente, se demostró que la señalización de la vía IRE1-XBP1 protege a las células de la apoptosis inducida por el estrés del RE. En uno de estos estudios se demostró que la protección celular se debe a una interacción física entre la proteína antiapoptótica HSP72 e IRE1, la cual aumenta la señalización de la vía IRE1-XBP1 [82]. En otro reporte se encontró que la protección de muerte celular inducida por el estrés del RE,

correlaciona con un aumento en la transcripción de AKT inducida por XBP1. AKT es una proteína involucrada en el mantenimiento de la supervivencia celular [83]. En el caso de la infección con rotavirus, sería interesante estudiar la expresión de ambas proteínas, HSP72 y AKT en células infectadas donde la expresión de NSP3 se encuentra silenciada.

El hecho de que la traducción de ATF4 sólo sea inducida cuando las células se incuban con rotavirus irradiado con luz UV, permite sugerir que el mecanismo de traducción selectiva dependiente de la fosforilación de eIF2 α podría también ser regulado por algún componente viral, ya que la replicación del virus causa la pérdida de este efecto. Sería importante determinar si durante la entrada de rotavirus se activa PERK, lo cual confirmaría la hipótesis de que además de la fosforilación del factor eIF2 α se necesita la actividad de PERK para que se lleve a cabo el mecanismo de traducción selectiva, a través del cual se traducen los mensajeros que codifican para ATF4, CHOP y GADD34. En el caso de GADD34, a pesar de que se observó un incremento en el nivel del mRNA, la proteína no se expresa o su función se inhibe durante la infección, ya que esta proteína forma parte de un complejo con la fosfatasa PP1, encargada de defosforilar a eIF2 α y conocemos que en células infectadas con rotavirus, la fosforilación del factor eIF2 α se mantiene a lo largo de la infección. En un estudio previo del laboratorio, se observó que el pretratamiento de las células MA104 con un inhibidor de la actividad del complejo PP1/GADD34, no afecta el estado de fosforilación de eIF2 α ni la síntesis de proteínas de rotavirus, lo

cual ha llevado proponer que la expresión y/o la función de la proteína GADD34 no son indispensables para la replicación de rotavirus [76]. Se ha reportado que la proteína GADD34 se detecta en niveles muy bajos en algunas líneas celulares y esto se debe a una degradación dependiente del proteasoma [84], en el caso de células MA104 es posible que ocurra algo similar, ya que observamos una expresión ligera de la proteína GADD34 sólo en presencia de un inhibidor del proteasoma (Datos no mostrados). Debido a que la inhibición del proteasoma representa un estímulo inductor de UPR y se conoce que la inhibición del proteasoma afecta severamente la replicación de rotavirus [85-86], resulta difícil determinar la expresión o la función de GADD34 en células infectadas por rotavirus. Cabe mencionar que en un estudio recientemente publicado, se observó la localización de las proteínas PERK, GADD34 y CHOP en los viroplasmos de células infectadas con una cepa de rotavirus porcino (OSU), esta observación permite sugerir que el secuestro de las proteínas reguladas por el estrés del RE podría ser otro de los mecanismos utilizados por los rotavirus para modular la UPR durante la infección viral [87].

El silenciamiento de cada una de las proteínas virales codificadas por el genoma de rotavirus, permitió conocer que varios eventos del ciclo replicativo de rotavirus contribuyen a la inducción de estrés en el RE. Interesantemente, la acumulación de las glicoproteínas virales VP7 y NSP4 en las membranas del RE y por lo tanto el ensamble final de las partículas infecciosas, es un evento que participa pero no es el estímulo principal, como se había pensado. El hecho de que la ausencia

de las proteínas virales VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2 y NSP5 disminuya drásticamente el nivel de estrés en el RE (medido por el nivel del mRNA de GRP78), podría indicar que la transcripción y la replicación del genoma contribuyen de manera importante a la inducción del estrés. Sin embargo, debido a que VP2 y VP6 parecen también estar implicadas en la síntesis de proteína viral [44], es difícil discernir con certeza el efecto individual de cada evento del ciclo replicativo en la inducción de estrés del RE. Dado que desde la unión y/o entrada de rotavirus, se observa un aumento en la traducción de ATF4, es posible considerar a la entrada de rotavirus como el evento iniciador de la UPR. El silenciamiento individual de genes de rotavirus permitió también identificar a NSP1 como otro regulador de XBP1, sólo que en este caso, la regulación parece ocurrir a nivel del mRNA. Actualmente no tenemos una explicación congruente acerca de la falta de expresión de los transcritos de XBP1 en ausencia de NSP1, se conoce que NSP1 tiene actividad de ligasa de ubiquitina (E3) y que su interacción con activadores transcripcionales de los genes de interferón los lleva a degradación [58-59]. Se conoce también que NSP1 puede interaccionar con la cinasa PI3K, la cual recientemente se ha descrito como un regulador positivo de la translocación de XBP1 al núcleo (88-89), sin embargo hasta ahora no se ha descrito ningún papel de NSP1 en el metabolismo del RNA celular. Se necesitan estudios adicionales para poder establecer el mecanismo empleado por NSP1 para regular el mRNA de XBP1. Por ejemplo sería importante determinar el momento en el que los transcritos de XBP1 dejan de expresarse y si la ausencia de la proteína NSP1 lleva a

la degradación específica del mRNA de XBP1 o bien es el resultado de una degradación general de mRNAs celulares.

En resumen, el presente estudio muestra que la replicación de rotavirus causa estrés del RE en la célula infectada, lo cual despierta una UPR que es modulada por la proteína no estructural NSP3. Si existen mecanismos adicionales de regulación a nivel de componentes específicos de la respuesta, queda aún por demostrarse.

IX. CONCLUSIONES

1.- La entrada de rotavirus a la célula huésped induce la traducción del factor transcripcional ATF4, el cual promueve la transcripción de genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo de aminoácidos y el control del estado oxido-reducción de la célula.

2.- La presencia de dcRNA en células MA104 no causa estrés del RE.

3.- La infección por rotavirus induce la activación de una UPR, la cual se modula a través de la proteína no estructural NSP3.

4.- La proteína viral NSP3 no está involucrada en la inhibición del mecanismo de traducción selectivo utilizado por ATF4 y dependiente de la fosforilación del factor eIF2 α .

5.- La proteína viral NSP1 participa en la degradación del mRNA de XBP1.

X. PERSPECTIVAS

- a) Determinar si el incremento en la traducción de ATF4 observado durante la entrada de rotavirus a la célula huésped depende de la actividad de PERK, lo cual apoyaría la hipótesis de que la fosforilación del factor eIF2 α mediada por PERK se necesita para que el mecanismo traduccional selectivo se lleve a cabo.
- b) La determinación del momento en la infección, en el cual ya no se detecta el mRNA de XBP1, así como el análisis de otros mRNAs celulares podría ayudar a definir el mecanismo a través del cual la proteína viral NSP1 participa en la degradación del mRNA del factor transcripcional XBP1.
- c) El silenciamiento de cada uno de los genes rotavirales permitiría identificar a la proteína (s) viral involucrada en la inhibición del mecanismo de traducción selectiva.

XI. REFERENCIAS

- 1.- Lederkremer, G. S. (2009). Glycoprotein folding, quality control and ER associated degradation. *Current Opinion in Struct Biol*, 19: 515-523.
- 2.- Espenshade, P. J. and Hughes, A. L. (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Ann Review of Genetics*, 41: 401-427.
- 3.- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 517-529.
- 4.- Ma, Y. and Hendershot, L. M (2002). The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell stress & chaperones*, 7: 222-229.
- 5.- Scröder, M. and Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Ann. Rev. Biochem*, 74: 739-789.
- 6.- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P and Ron, D. (2000).

Dynamics interaction of BIP and ER stress transducers in the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 2: 326-332.

7.- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of Bip/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*, 3: 99-111.

8.- Kim, R., Tanabe, E.M. and Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*, 1: 5-13.

9.- We, R. C., Jiang, H. Y and Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Society*, 34: 7-11.

10.- Kaufman R.J. (2004). Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 29:152-158.

11.- Jiang, H-Y., Wek, S. A., McGrath, B. C., Lu, D., Hai, T., Harding, H. P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D. R. and Wek, R. (2004). Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol and Cell Biol*, 24:1365-1377.

12.- Vatter, K. M. and Wek, R. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *PNAS*, 101: 11269-11274.

13.- Zhou, D., Palam, L. R., Jiang, L., Narasimhan, J., Staschke, K. A. and Wek, R. C. (2008). Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J of Biol Chem*, 283: 7054-7073.

14.- Jousse, C., Bruta, A., Carraro, V., Urano, F., Ferrara, M. and Ron, D. (2001). Inhibition of CHOP translation by a peptide encoded by an open reading frame localized in the chop 5'UTR. *Nucleic Acids Research*, 29: 4341-4351.

15.- Lee, Y-Y., Cevallos, R. C. and Jan, E. (2009). An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *J of Biol Chem*, 284: 6661-6673.

16.- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N, Yun, Ch., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M. and Ron,

- D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11: 619-633.
- 17.- Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S. F, and Lee, A. S. (2003). Induction of Grp78/Bip by translational block. Activation of the grp78 promoter by ATF4 through an upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J of Biol Chem*, 278: 37375-37385.
- 18.- Fawcett, T. W., Martindale, J. L., Guyton, K. Z., Hai, T and Holbrook, N. J. (1999). Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J*, 339: 135-141.
- 19.- Bailey, D. and O'Hare, P. (2007). Transmembrane bZIP transcription factors in the ER stress signaling and the unfolded protein response. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9: 1-17.
- 20.- Brush, M. H., Weiser, D. and Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol and Cell Biol*, 23: 1292-1303.
- 21.- Ma, Y. and Hendershot, L. M. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem*, 278: 34864-34873.
- 22.- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl-2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21: 1249-59.
- 23.- Hong-Lin, S., Liao, Ch-L, and Lin, Y-L. (2002). Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J of Virol*, 76: 4162-4171.
- 24.- Jordan, R., Wang, L., Graczik, T. M., Block, T. M. and Romano, P. R. (2002).

Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J of Virol*, 76: 9588-9599.

25.- Shen, J and Prywes, R. (2004). Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *J Biol Chem*, 279: 43046-43051.

26.- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. and Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct*, 33: 78-89.

27.- Bommasamy, H., Back. S. H., Fagone, P. Lee, K., Meshinchi. S., Vink. E., Sriburi. R., Frank, M., Jockowski, S., Kaufman, R. J. and Brewer, P. (2009). ATF6 induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J of Cell Science*, 122: 1626-1636.

28.- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. and Brewer, J. W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J of Cell Biol*, 167: 35-41.

29.- Tirasophon, W., Welihinda, A. A. and Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Irep) in mammalian cells. *Genes Dev*, 12: 1812-1824.

30.- Calton, M., Zeng, H. P., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to the secretory capacity by processing the XBP1 mRNA. *Nature*, 415: 92-96.

31.- Uemura, A., Oku, M., Mori, K. and Yoshida, H. (2009). Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J of Cell Science*, 122: 2877-2886.

- 32.- Lee, A-H., Iwakoshi, N. N. and Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a subset of the endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol and Cell Biol*, 23: 7448-7459.
- 33.- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, EA., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H. P., Goodman, A. G., Harant, H., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G. and Ron, D. (2006). Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell*, 126: 727-739.
- 34.- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 and XBP1. *Developmental Cell*, 13: 365-376.
- 35.- Yan, W., Frank, C. L., Korth, M. J., Sopher, B. L., Novoa, I., Ron, D. and Katze, M. G. (2002). Control of PERK eIF2 kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58^{IPK}. *PNAS*, 99: 15920-15925.
- 36.- Lee, T. G., Tomita, J., Hovanessian, A. G and Katze, M. G. (1990). Purification and partial characterization of a cellular inhibitor of the interferon-induced protein kinase of Mr 68,000 from influenza virus-infected cells. *PNAS* 87, 6208-6212.
- 37.- Bishop, R. (2009). Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J of Gastroenterol and hepatol*, 24:81-85.
- 38.- Pasavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K and Prasad, B. V. V. (2006). Rotavirus proteins: Structure and assembly. *CTMI*, 309: 189-219.
- 39.- Arias, CF., Romero, P., Alvarez, V, and Lopez, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J of Virol*, 70: 5832-5839.
- 40.- Isa, P., Gutierrez, M., Arias, C. F, and López, S. (2008). Rotavirus cell entry. *Future Virol*, 3: 135-146.
- 41.- Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F, and López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells

through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J of Virol*, 84: 9161-9169.

42.- Chemello, M. E., Aristimuño, O. C., Michelangeli, F, and Ruiz, M-C. (2002). Requirement for vacuolar H⁺-ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J of Virol*, 76: 13083-13087.

43.- Estes, M. K. (2001). Rotaviruses and their replication. *In Fields Virology*, 4th edn 1747-1785. Edited by D. N. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.

44.- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C. F and López, S. (2009). Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA interference. *J of Virology*, 83: 8819-8831.

45.- Patton, J. T., Silvestri, L. S., Tortorici, M. A., Vasquez-Del Carpio, R, and Taraporewala, Z. F. (2006). Rotavirus genome replication and morphogenesis: Role of viroplasm. *CTMI*, 309: 169-187.

46.- López, T., Camacho, M., Zayas, M., Najera, R., Sánchez, R., Arias, C. F and López, S. (2005). Silencing the morphogenesis of Rotavirus. *J of Virology*, 79: 184-192.

47.- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S, and Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 304-306.

48.- Gray, J, and Iturriza-Geomora, M. (2011). Rotaviruses. *Methods in Mol Biol*, 665: 335-355.

49.- Ciarlet, M, and Estes, M. K. (2001). Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Current Opinion in Microbiol*, 4: 435-441.

50.- Karawai, T, and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol*, 11: 373-384.

51.- Dostert, C., Meylan, E, and Tschopp, J. (2008). Intracellular pattern-recognition receptors. *Advanced drug delivery review*, 60: 830-840.

- 52.- Crozat, K., Vivier, E, and Dalod, M. (2009). Crosstalk between components of the innate immune system: promoting antimicrobial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunological reviews*, 227: 129-149.
- 53.- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P, and Rice, Ch. M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature letter*, 472: 481-487.
- 54.- LaMonica, R., Kocer, S., Nazarova, J., Dowling, W., Geimonen, E., Shaw, R. D, and Mackow, E. R. (2001). VP4 Differentially regulates TRAF2 signaling, disengaging JNK activation while directing NFkB to effect rotavirus-specific cellular responses. *J of Biol Chem*, 276: 19889-19896.
- 55.- Frias, A. H., Vijay-Kumar, M., Gentsch, J. R., Crawford, S. E., Carvalho, F. A., Estes, M. K, and Gewirtz, A. T. (2010). Intestinal epithelia activate antiviral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components. *Mucos Immunol*, 3: 622-632.
- 56.- Broquet, A. H., Hirata, Y., McAllister, C. S, and Kagnoff, M. F. (2011). RIG-1/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J of Immunol*, 186: 1618-1626.
- 57.- Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L, and Hardy, M. E. (2002). Interferon Regulatory Factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J of Virol*, 76: 9545-9550.
- 58.- Barro, M and Patton, J. T. (2007). Rotavirus NSP1 inhibits expression of Type I interferon by antagonizing the function of Interferon Regulatory Factors IRF3, IRF5 and, IRF7. *J of Virol*, 81: 4473-4481.
- 59.- Graff, J. W., Ewen, J., Ettayebi, K, and Hardy, M. E. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J of Gen Virol*, 88: 613-620.

- 60.- Graff, J. W., Ettayebi, K, and Hardy, M. E. (2009). Rotavirus NSP1 inhibits NFκB activation by inducing proteasome-dependent degradation of βTrCP: A novel mechanism of IFN antagonism. *Plos Pathogens*, 5: 1-12.
- 61.- Holloway, G., Truong, T. T, and Coulson, B. S. (2009). Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NFκB. *J of Virol*, 83: 4942-4951.
- 62.- Sen, A., Feng, N., Ettayebi, K., Hardy, M. E, and Greenberg, H. B. (2009). IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteosomal degradation. *J of Virol*, 83: 10322-10335.
- 63.- Maruri-Avidal, L., López, S. and Arias, C. (2008). Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J of Virol*, 82: 5368-5380.
- 64.- Montero, H., Arias, C and López, S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 but prevents the formation of stress granules. *J of Virology*, 82: 1496-1504.
- 65.- Gonzalez, R. A., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S, and Arias, C. F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol*, 145: 1963-1973.
- 66.- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T and Mori, K. (1998). Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response element Responsible for transcriptional induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. *Biol Chem J*, 50: 33741-33749.
- 67.- Lai, W. L, and Wong, N. S. (2005). ROS mediates 4HRP-induced posttranscriptional expression of the Gadd153 gene. *Free Radic Biol Med*, 38: 1585-1593.
- 68.- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, RJ., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J of Biol. Chem* 275, 27013-27020.

- 69.- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- 70.- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- 71.- Shang, J. and Lehrman, M. A. (2004). Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of targets transcripts. *Biochem Biophys Res Commun*, 317: 390-396.
- 72.- Isler, J. A., Skalet, A. H y Alwine, J. C. (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J of Virology* 79, 6890-6899.
- 73.- Tardif, K. D., Mori, K., Kaufman, R. J. and Siddiqui, A. (2004). Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the Unfolded Protein Response. *J of Biol Chem*, 279: 17158-17164.
- 74.- Chan, Ch-P., Siu, K-L., Chin, K-T., Yuen, K-Y., Zheng, B and Jin, D-Y. (2006). Modulation of the unfolded protein response by severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J of Virol* 80, 9279-9287.
- 75.- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C. Z., and Hotamisligil, G. S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*, 140: 338-348.
- 76.- Rojas, M., Arias, C. F, and López, S. (2010). Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus infection. *J of Virol*, 84: 10457-10466.
- 77.- Blais, J. D., Filipenko, V., Bi, M., Harding, H. P., Ron, D., Koumenis, C., Wouters, B. G. and Bell, J. C. (2004). Activating Transcription Factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol and Cell Biol*, 24: 7469-7482.

- 78.- Jheng, J-R., Lau, K. S., Tang, W-F., Wu, M-S. and Horng, J. T. (2010). Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. *Cell Microbiol*, 12: 796-813.
- 79.- Baltzis, D., Qu, L-K., Papadopoulou, S., Blais, J. D., Bell, J. C., Sonenberg, N and Koromilas A. E. (2004). Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2 α kinases PERK and PKR. *J of Virol* 78, 12747-12761.
- 80.- Montero, H., Arias, C and López, S. (2006). Rotavirus Nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein síntesis. *J. of Virology* 80: 9031-9038.
- 81.- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y. and Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and conditions-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cel*, 27: 53-66.
- 82.- Gupta, S., Deepti, A., Deegan, S., Lisbona, F., Hetz, C., and Samali, A. (2010). HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1-XBP1 signaling through a physical interaction. *Plos biology* 7: 409-419.
- 83.- Ishigaki, I., Fonseca, S. G., Osowski, C. M., Jurczyc, A., Shearstone, J. R., Zhu, L. J., Permutt, M. A., Greiner, , D. L., Bortell, R., and Urano, F. (2010). AATF mediates an antiapoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1. *Cell Death and differentiation* 17: 774-786.
- 84.- Brush, M. H, and Shenolikar, S. (2008). Control of cellular GADD34 levels by 26S proteasome. *Mol and Cel Biol*, 28: 6989-7000.
- 85.-Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Lee, K. P. and Boise, L. H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myelome cells. *Blood*, 107: 4907-16
- 86.- López, T., Silva-Ayala, D., López, S and Arias, C. F. (2011). Replication of the Rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system. *J of Virol*, 85: 11964-11971.
- 87.- Zambrano, J. L., Ettayebi, K., Maaty, W. S., Faunce, N. R., Bothner, B. and

Hardy, M. E. (2011). Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virology J*, 8: 359.

88.- Bagchi, P., Dutta, D., Chattopadhyay, S., Mukherjee, A., Halder, U. Ch., Sarkar, S., Kobayashi, N., Komoto, S., Taniguchi, K. and Chawla-Sarkar, M. (2010). Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. *J of Virol*, 84: 6834-6845.

89.- Park, S. W., Zhou, Y., Lee, J., Lu, A., Sun, Ch., Chung, J., Ueki, K. and Ozcan, U. (2010). The regulatory subunits of PI3K, p58 α and p58 β , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nature*, 6: 429-438.

PAPEL DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS NO PLEGADAS EN LA REPLICACIÓN Y PATOGÉNESIS VIRAL

Los virus son patógenos intracelulares obligados, que dependen de los componentes estructurales y metabólicos de la célula huésped para lograr una replicación exitosa. Para la formación de nuevas partículas infecciosas, se necesita la síntesis de una gran cantidad de proteínas virales que eventualmente sobrepasa la capacidad del RE y da lugar a una acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas en este organelo. Para contender con dicho estrés, la célula inicia una respuesta a proteínas no plegadas o UPR, que ajusta la capacidad de plegamiento de las proteínas de acuerdo a la demanda impuesta por la infección y cuando ésta es persistente la muerte celular es inducida [1]. En células eucarióticas tres proteínas transmembranales del RE, PERK, ATF6 e IRE1 inician la UPR, la cual da lugar a una inhibición general de la síntesis de proteínas y un incremento en la actividad de plegamiento y degradación de proteínas. Numerosos estudios indican que la UPR funciona como un mecanismo de defensa ya que ésta limita la replicación viral. A su vez, los virus han desarrollado diversas estrategias para suprimir la UPR de la célula huésped. Otros virus utilizan la UPR en beneficio de su replicación. Se ha descrito que el control viral sobre la UPR puede aumentar la supervivencia o dirigir a la célula infectada hacia la muerte y por lo tanto puede jugar un papel fundamental en la patogénesis producida. A continuación se describe el papel de cada uno de los efectores de la UPR en la replicación y la patogénesis viral.

a) PERK y la infección viral.

PERK es una cinasa que al ser activada fosforila al factor de inicio de la traducción $eIF2\alpha$, lo cual da lugar a una inhibición generalizada de la síntesis de proteína celular mientras favorece un mecanismo de traducción selectiva que permite la síntesis de proteínas involucradas en la recuperación del estrés incluyendo el activador de la transcripción 3, 4, 5 (ATF3, ATF4, ATF5) así como proteínas que responden a daño del DNA como GADD34 y CHOP, entre otros [2-3]. Los factores de transcripción regulan la síntesis de múltiples genes involucrados en procesos celulares que en conjunto contribuyen a disminuir el estrés. La expresión de GADD34 y CHOP se ha asociado también con la muerte celular, bajo condiciones en las cuales el estrés de RE se mantiene por un tiempo prolongado. La proteína GADD34 funciona como subunidad regulatoria de la fosfatasa PP1, la cual defosforila al factor $eIF2\alpha$, restableciendo así la síntesis de proteínas celulares [4-5].

La fosforilación de $eIF2\alpha$ es un evento inmediato que ocurre dentro de las primeras horas de infección causada por diversos virus. En el caso de algunos virus, se ha demostrado que la fosforilación de $eIF2\alpha$ correlaciona con la activación de más de una de las cinasas. Por ejemplo, la infección por el enterovirus 71 (ENV71) causa la activación de PERK y PKR [6], mientras el virus causante de la estomatitis vesicular (VSV) induce la actividad de PERK, PKR y GCN2 [7-8]. Un incremento en la susceptibilidad a la infección por VSV en células carentes de PERK o PKR indica la participación de estas cinasas en la resistencia celular a la infección por este virus.

Debido a que la síntesis de proteínas es un proceso fundamental para la formación de progenie viral, los virus han desarrollado diversas estrategias para impedir o revertir la fosforilación de eIF2 α . Por ejemplo, la proteína de envoltura (E2) del virus de la hepatitis C (HCV), se une al dominio de cinasa de PKR y/o PERK para impedir su activación durante la infección [9]. Por un mecanismo similar, la proteína B del virus herpes simple tipo I (HSV-1) impide la activación de PERK [10]. Por otra parte, el genoma de HSV-1 codifica para la proteína ICP γ -34.5, la cual mimetiza la función de GADD34 al interactuar con la proteína fosfatasa PP1, encargada de defosforilar a eIF2 α [11]. Por lo tanto, HSV-1 no sólo ha desarrollado los mecanismos para inhibir, sino también para revertir la fosforilación de eIF2 α . En estudios *in vivo*, se demostró que las cepas de HSV-1 mutantes en la proteína ICP γ -34.5 son incapaces de producir encefalitis letal en ratones infectados, debido a que las cepas mutantes no logran completar su ciclo replicativo [12].

De forma similar a HSV-1, el coronavirus causante de bronquitis infecciosa (IBV) suprime la fosforilación de eIF2 α mediante la inhibición de PKR y la expresión rápida de GADD34, mientras que el virus del Dengue (DENV) promueve la expresión de la proteína eIF2 α e induce la transcripción de GADD34 para compensar y restablecer la síntesis de proteínas, respectivamente [13-14]. La expresión inmediata de GADD34 inducida por HSV-1, IBV y DENV indica que la replicación de estos virus requería de la actividad de la fosfatasa PP1 para el restablecimiento de la síntesis de proteína viral, lo cual se confirmó al encontrar que el pretratamiento de

las células con inhibidores de la fosfatasa PP1/GADD34, reduce significativamente la síntesis de proteína viral y en consecuencia la progenie viral en células infectadas por HSV-1, IBV o DENV [13-15]. Interesantemente y en contraste a lo reportado con los virus antes mencionados, la ausencia de GADD34 resultó en una mayor cantidad de progenie viral infecciosa de VSV [16], indicando que GADD34 limita la eficiencia replicativa de VSV, sin embargo en el caso de VSV el efecto de GADD34 no fue debido a la ausencia de actividad de fosfatasa sino a la falta de una inhibición de la cinasa de proteínas mTOR, otro regulador del inicio de la síntesis de proteínas a nivel de la proteína de unión al cap, eIF4E. En resumen, los reportes previamente descritos indican que GADD34 regula a dos niveles distintos el inicio de la síntesis de proteínas, lo cual afecta diferencialmente la replicación viral.

Quizas lo que más sorprende por ahora, es que algunos virus como el coronavirus murino (MHV), el virus Semliki Forest (SFV), el rotavirus de simio (RRV), el reovirus y el ENV71 han desarrollado mecanismos independientes de la función de eIF2 α para la síntesis de proteína viral y la fosforilación de eIF2 α , más que interferir con su replicación muy probablemente la favorece al reducir la competencia entre los mRNAs virales y celulares por los componentes de la maquinaria traduccional de la célula. La infección por estos virus se caracteriza por la fosforilación continua de eIF2 α , la cual da lugar a una inhibición traduccional celular severa, mientras la síntesis de proteína viral ocurre de manera eficiente [17-20]. Una observación interesante es la descrita con citomegalovirus humano (HCMV), el cual posee la habilidad para

modular el grado de fosforilación de eIF2 α de manera que mantiene simultáneamente la síntesis de proteína general y la traducción selectiva [21]. Esta observación indica que la replicación de este virus depende de alguna proteína celular expresada bajo condiciones de eIF2 α fosforilado. En un estudio posterior, la caracterización de cepas mutantes de HCMV identificó al gen viral pLU38 como un estimulador de la síntesis del factor transcripcional ATF4, uno de los mecanismos empleados por HCMV para prolongar la supervivencia de la célula infectada [22]. De forma similar a HCMV, reovirus parece tomar ventaja de las funciones llevadas a cabo por ATF4, ya que su replicación en MEFs carentes de ATF4 -/- resultó en una progenie viral reducida, comparada con los MEFs silvestres [20].

La expresión de CHOP generalmente se asocia con la muerte celular en diversas condiciones de estrés. En el caso de la infección por virus líticos como DENV, el virus de la diarrea bovina (BVDV), el virus de encefalitis japonés (JEV) y el virus del Oeste del Nilo (WNV) la expresión de CHOP incrementa en la fase tardía de la infección y ésta correlaciona con la expresión reducida de la proteína Bcl-2 [14, 23-25]. Consistente con el papel de CHOP en la muerte celular inducida por virus, en MEFs CHOP -/- la muerte celular causada por la infección por WNV temporalmente se retrasó, lo cual correlacionó con un título viral mayor. Además la expresión estable de la proteína Bcl-2 cambió la infección de aguda a crónica en el caso de JEV, SFV, DENV y WNV. En un estudio reciente se demostró que la cepa PL046 del virus Dengue es capaz de suprimir la fosforilación de eIF2 α inducida por PERK y la

expresión de CHOP no se encontró asociada con una expresión reducida de la proteína Bcl-2 y la muerte celular. En este reporte, en contraste a lo descrito previamente, la habilidad de DENV para prevenir la fosforilación de eIF2 α se propuso como un medio para prolongar la supervivencia de la célula infectada [26]. En el caso de WNV, la infección de una línea celular epitelial con una cepa atenuada (Kunjin) resulto en la expresión de solo algunos genes regulados por estrés de RE, sugiriendo una modulación de la UPR por WNV [27]. Por lo tanto, las consecuencias fisiológicas causadas por la infección de algunos virus dependen no solo de la cepa sino también de la línea celular utilizada. Es posible que debido a la función de CHOP para promover la muerte de células infectadas, algunos virus como HSV-1, HCMV, VSV y el virus causante del síndrome agudo respiratorio (SARS) impidan su expresión, ya que en células infectadas por estos virus CHOP no es detectado [28]. En conjunto, los estudios previamente descritos indican que la muerte celular mediada por CHOP constituye un mecanismo importante de defensa capaz de restringir la capacidad replicativa de algunos virus (Figura 1).

b) ATF6 y la replicación viral

El activador de la transcripción 6 (ATF6) se localiza como precursor en la membrana del RE, sin embargo en respuesta al estrés de RE ATF6 se transloca al aparato de Golgi, donde sufre un procesamiento proteolítico que lo convierte en un factor transcripcional activo [29]. ATF6 activo estimula la transcripción de genes que codifican tanto para chaperonas como para proteínas involucradas en la

degradación de proteínas [30].

Para los virus el plegamiento y/o la modificación post-traducciona l de sus proteínas representa un evento crucial, particularmente para las proteínas que forman parte de la envoltura lipídica o las espículas del virión, debido a que éstas participan en la unión y/o la entrada del virus a la célula huésped. Se ha descrito que el plegamiento correcto de proteínas virales de la envoltura como la hemaglutinina del virus de influenza, DENV y VSV depende de su interacción con la chaperona GRP78, lo cual es importante para el proceso de maduración de los viriones infecciosos [31-32]. En células infectadas por rotavirus o JEV, el silenciamiento de la proteína GRP78 dió lugar a la formación de viriones defectivos en la unión a su célula huésped [33-34]. En el caso de la infección por el virus Coxsackie B3 (CVB3), el silenciamiento de ATF6 o GRP78 causó muerte celular prematura; lo cual redujo drásticamente la producción de virus infeccioso [35]. En el caso de SFV, el uso de partículas replicativas carentes de alguno o de todos los genes estructurales del virus, demostró que las proteínas que componen la envoltura viral, las cuales son glicosiladas en el RE, son las responsables de inducir una UPR y acelerar la muerte de las células infectadas [18].

Por otra parte se ha observado que durante la infección con los virus DENV, BVDV, WNV, SFV o JEV, la acumulación de proteína viral correlaciona con un aumento gradual en la expresión de las proteínas reguladas por ATF6 como GRP78, GRP94, calnexina y calreticulina [14, 18, 23-25]. Aunque un aumento en la capacidad de

plegamiento de proteínas producido por la actividad de ATF6 beneficiaría la replicación de algunos virus como los previamente descritos, un incremento en la actividad del proteasoma podría interferir con la formación de progenie viral de otros virus como ENV71, el cual parece controlar de manera muy estricta el nivel de expresión de la proteína GRP78 porque en células donde esta proteína se expresó en un nivel superior al inducido por el virus, la producción de progenie viral se redujo considerablemente [6]. El citomegalovirus humano (HCMV) por su parte, ha desarrollado mecanismos virales independientes de la actividad de ATF6 para regular la transcripción de GRP78 (36-37). Al parecer tanto HCMV como ENV71 tienen mecanismos para inducir la degradación de la forma activa de ATF6, ya que en células infectadas por estos virus, aún cuando se observa una reducción en el precursor de ATF6, la forma activa de este factor transcripcional no se detectó. En el caso del coronavirus murino (MHV), la sobreexpresión de ATF6 producida de forma recombinante se detectó incluso en el núcleo de las células infectadas, indicando que la localización nuclear de ATF6 no es un evento inhibido por MHV, sin embargo la transcripción de los genes regulados por ATF6 no se indujo [17]. En resumen, los estudios previamente descritos indican que los virus han desarrollado diversos mecanismos para controlar la activación y/o la actividad transcripcional de ATF6 (Figura 1).

c) IRE1 y la replicación viral

IRE1 es una enzima con actividad de cinasa y endorribonucleasa [38]. Una vez activa,

IRE1 corta un intrón presente el transcrito primario de XBP1, lo cual aumenta su síntesis [39]. Una vez expresada, XBP1 se dirige al núcleo donde regula la transcripción de múltiples genes incluyendo chaperonas y proteínas involucradas en la degradación dependiente del proteasoma [40].

De forma similar a los otros dos efectores de la UPR, se ha descrito que la actividad de IRE1 la regulan los virus: La infección por ENV-71 aumentó alrededor de ocho veces el mRNA de XBP1; sin embargo se detectó sólo una cantidad ligera del mRNA procesado de XBP1. Se desconoce el mecanismo a través del cual ENV71 aumenta la transcripción de XBP1, ya que este virus parece bloquear la activación de ATF6 [6]. En el caso de MHV, HCV y HCMV, la infección por estos virus provocó una acumulación del transcrito procesado de XBP1, sin embargo la transcripción de los genes regulados por XBP1 como EDEM y P58, no se indujo [17, 21 y 41]. En el caso de HCV, los estudios *in vivo* realizados con muestras de hígado provenientes de pacientes con hepatitis C crónica, son controversiales; mientras en un trabajo se reportó un incremento en el mRNA de EDEM y P58, el otro trabajo obtuvo resultados similares a los previamente encontrados en células en cultivo [42-43]. Por lo tanto, se necesita investigación adicional para esclarecer el efecto de HCV sobre XBP1.

Para algunos virus las membranas del RE constituyen una fuente de lípidos muy importante para la formación de la envoltura viral. Debido a su papel en la síntesis de lípidos, la actividad de ATF6 y XBP1 es crítica para aumentar el tamaño del RE, cuando se acumula una gran cantidad de proteínas en este organelo. La ausencia de

XBP1, no modificó la progenie viral producida en células infectadas por virus envueltos como DENV, WNV o JEV, lo cual sugirió que la función de XBP1 no es indispensable para la infección productiva por estos virus; sin embargo la ausencia de XBP1 causó un efecto citopático más severo [24]. Por lo tanto, además de aumentar la capacidad de plegamiento y degradación de proteínas, la expresión de XBP1 es importante para mantener la integridad estructural de la célula durante la infección viral.

La regulación de P58 también se ha asociado con la patogénesis viral. En células en cultivo, la deficiencia de P58 causó una reducción significativa en la producción del virus de influenza A (IAV) [44]. Esta observación sugiere que la restauración de la síntesis proteica mediada por P58 es indispensable para la replicación de este virus. Posteriormente, se demostró que la tasa de mortalidad inducida por el virus influenza A fue mayor en ratones deficientes en P58, en comparación con los ratones normales. Interesantemente, la muerte celular masiva no fue debida a una carga viral mayor, sino a una patología pulmonar más severa caracterizada por una respuesta inmunológica, inflamatoria y apoptótica exacerbada. Los resultados obtenidos permitieron a este grupo de investigación nombrar a P58 como "*inhibidor celular de la respuesta de defensa del huésped*" ya que esta proteína no sólo controla la respuesta de estrés de RE sino también otras respuestas de defensa celular como la inmune y la inflamatoria, las cuales en conjunto prolongan la supervivencia celular y al mismo tiempo favorecen la replicación del virus influenza

[45].

Otros virus como el Coxsackie B3 y el reovirus han desarrollado estrategias para inhibir específicamente a P58 no sólo a nivel del mRNA, sino también a nivel de la proteína. Para investigar la función de P58 en la replicación de CVB3, células que expresan establemente a P58 se infectaron con este virus y se encontró que P58 provoca una muerte celular retrasada, la cual correlacionó con un incremento en la progenie viral [35]. En contraste a lo descrito con el virus de influenza, en ausencia de P58, la infección con reovirus resultó en una producción mayor de progenie viral, indicando que P58 limita la replicación de reovirus (44). En base a los reportes previamente descritos, P58 ejerce varias funciones celulares, las cuales parecen afectar diferencialmente la replicación viral y la inhibición de la expresión de P58 podría ser una de las estrategias empleadas por los virus para provocar la muerte celular (Figura 1).

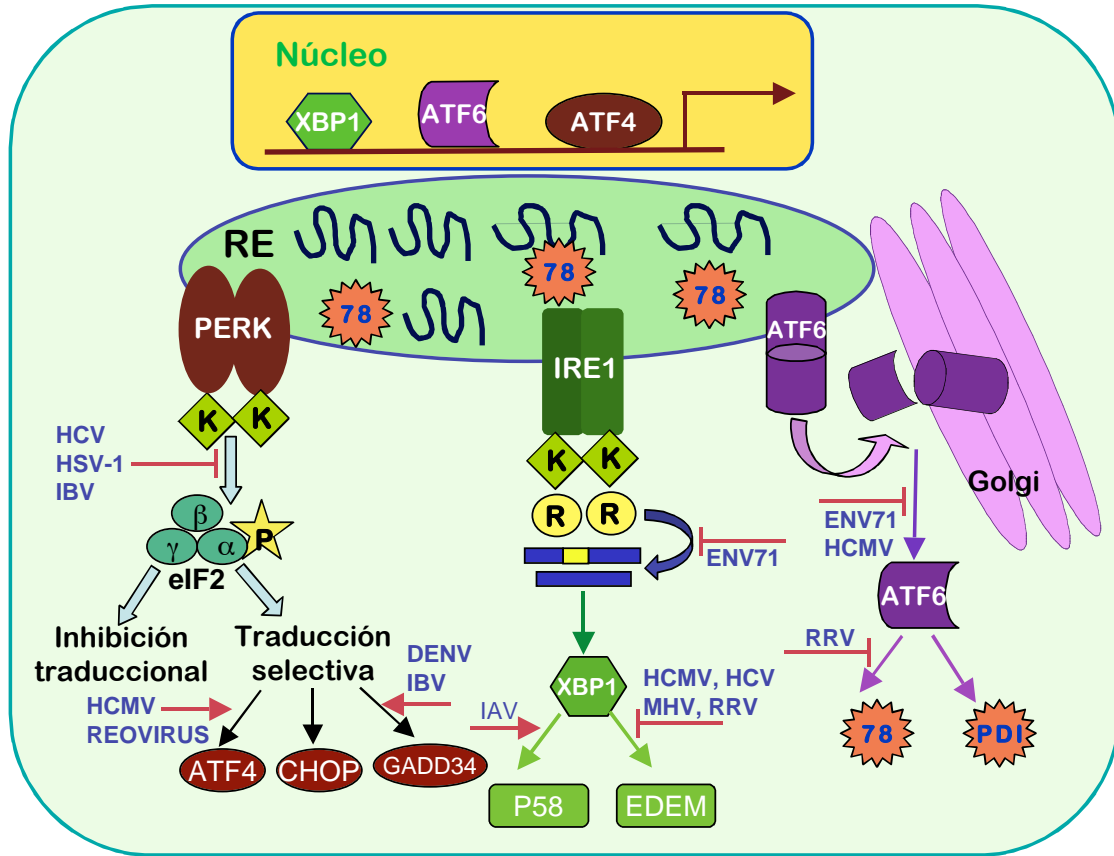


Figura 1. Control viral de la respuesta a proteínas no plegadas, UPR.

Los tres vías de señalización de la UPR son sujetas al control viral, algunos virus inhiben específicamente la expresión de proteínas (\perp), mientras que otros virus estimulan la expresión de proteínas (\rightarrow).

Referencias

1. He B: Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* 2006, 13:393-403.
2. Harding, H. P., Zhang, Y and Ron, D. (1999). Protein traslation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397: 271-274

3. Ron D: **Translational control in the endoplasmic reticulum stress response.** *J Clin Invest* 2002, 110:1383-1388.
4. Ma Y, Hendershot LM: **Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress.** *J Biol Chem* 2003, 278:34864-34873.
5. Marcianiak, S., Yun, Ch., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H y David Ron. (2004). **CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.** *Genes and Development* 18, 3066-3077.
6. Jheng, J-R., Lau, K. S., Tang, W-F., Wu, M-S. and Horng, J. T. (2010). **Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71.** *Cell Microbiol* 2010, 12: 796-813.
7. Baltzis, D., Qu, L-K., Papadopoulou, S., Blais, J. D., Bell, J. C., Sonenberg, N and Koromilas A. E. (2004). **Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2 α kinases PERK and PKR.** *J of Virol* 78, 12747-12761.
8. Berlanga, J. J., Ventoso, I., Harding, P. H., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N, Cardoso, L and Haro, C. (2006). **Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 α kinase GCN2 against RNA viruses.** *EMBO J* 25, 1730-1740.
9. Pavio, N., Romano, P.R., Graczyk, T. M., Feinstone, S. M and Taylor, D. R. (2003). **Protein synthesis and Endoplasmic Reticulum Stress can be modulated by the Hepatitis C virus envelope protein E2 through the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase PERK.** *J of Virol* 77, 3578-3585.
10. Mulvey, M., Arias, C and Mohr, I. (2007). **Maintenance of Endoplasmic Reticulum (ER) homeostasis in Herpes simplex virus type 1-infected**

cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *J of Virology* 81, 3377-3390.

11. Cheng, g., Feng, Z and He, B. (2005). Herpes Simplex Virus 1 infection activates the Endoplasmic Reticulum Resident Kinase PERK and Mediates eIF2 dephosphorylation by the $\gamma 1^{34.5}$ protein. *J of Virol* 79, 1379-1388.
12. Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, DA and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP 34.5 confers neurovirulence by targeting the beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1: 23-35.
13. Wang, X., Liao, Y., Yap, P.L., Png, K. J., Tam, J. P and Liu, D. X. (2009). Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining de novo protein synthesis in virus infected-cells. *J of Virol* 83, 12462-12472.
14. Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q. Y., Vasudevan, S., Chevet, E. and Gu, F. (2007). Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol J* 4, 1-10.
15. Boyce, M., Bryant, K., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ma, D., Coen, D. M., Ron, D and Yuan, J. (2005). A selective inhibitor of eIF2 dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-939.
16. Minami, K., Tambe, Y., Watanabe, R., Isono, T., Haneda, M., Isobe, K-I., Kobayashi, T., Hino, O., Okabe, H., Chano, T and Inoue, H. (2007). Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J of Virol* 81, 11106-11115.

17. Bechill, J., Chen, Z., Brewer, J. W. and Baker, S. C. (2008). **Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression.** *J of Virol* 82, 4492-4501.
18. Barry, H., Fragkoudis, R., Ferguson, M. C., Lulla, A., Merits, A., Kohl, A. and Fasakerley, J. K. (2010). **Semliki Forest virus-induced endoplasmic reticulum stress accelerates apoptotic death of mammalian cells.** *J of Virol* 84, 7369-7377.
19. Montero, H., Rojas, M., Arias, C. F and López, S. **Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules.** *J of Virology* 82, 1496-1504.
20. Smith JA, Schmechel SC, Raghavan A, Abelson M, Reilly C, Katze MG, Kaufman RJ, Bohjanen PR, Schiff LA: **Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response.** *J Virol* 2006, 80:2019-2033.
21. Isler, J. A., Skalet, A. H y Alwine, J. C. (2005). **Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response.** *J of Virology* 79, 6890-6899.
22. Xuan, B., Qian, Z., Torigoi, E and Yu, D. (2009). **Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses Endoplasmic Reticulum stress-induced cell death.** *J of Virol* 83, 3463-3474.
23. Jordan, R., Wang, L., Graczik, T. M., Block, T. M. and Romano, P. R. (2002). **Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells.** *J of Virol* 76, 9588-9599.
24. Yu, Ch-Y., Hsu, Y-W., Liao, Ch-L. And Lin, Y-L. (2006). **Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the Unfolded Protein Response to cope with Endoplasmic Reticulum Stress.** *J of Virology* 80, 11868-11880.

25. Medigeshi, G. R., Lancaster, A. M., Hirsch, A. J., Briese, T., Lipkin, W. I., DeFilippis, V., Fruh, K., Mason, P. W., Nikolich-Zugich, J. and Nelson, J. A. (2007). **West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis.** *J of Virol* 81, 10849-10860.
26. Peña, J. and Harris, E. (2011). **Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner.** *J of Biol Chem* 286, 14226-14236.
27. Ambrose, R. L. and Mackenzie, J. M. (2011). **West Nile Virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion.** *J of Virol* 85, 2723-2732.
28. Chan, Ch-P., Siu, K-L., Chin, K-T., Yuen, K-Y., Zheng, B and Jin, D-Y. (2006). **Modulation of the unfolded protein response by severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein.** *J of Virol* 80, 9279-9287.
29. Shen J. and Prywes R. (2004) **Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6.** *J Biol Chem* , 279:43046-43051.
30. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2008). **ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum.** *Cell Struct Funct* 2008, 33:75-89.
31. Ueda, M., Yamate, M., Du, A., Daidoji, T., Okuno, Y., Ikuta, K and Nakaya, T. (2008). **Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus.** *Virus Res* 136, 91-97.

32. Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, Ch., Netsawang, J., Puttikhund, Ch., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., Thiemmecca, S., Sriburi, R., Sittisombut, P. M and Yenchitsomanus, P-t. (2009). **Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production.** *Biochem and Biophys Res Comms* 397, 196-200.
33. Maruri-Avidal, L., López, S. and Arias, C. (2008). **Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles.** *J of Virol* 82, 5368-5380.
34. Wu, Y-P., Chang, Ch-M., Hung, Ch-Y., Tsai, M-Ch., Schuyler, S. C. and Yung-Liang, R. (2011). **Japanese encephalitis virus co-opts the ER-stress response protein GRP78 for viral infectivity.** *Virol J* 8, 128-135.
35. Zhang, H. M., Ye, X., Su, Y., Yuan, J., Liu, Z., Stein, D. A. and Decheng, Y. (2010). **Coxsackievirus B3 infection activates the unfolded protein response and induces apoptosis through downregulation of P58^{IPK} and activation of CHOP and SREBP1.** *J of Virol* 84, 8446-8459.
36. Shi-Chen Ou D, Lee SB, Chu CS, Chang LH, Chung BC, Juan LJ: **Transcriptional activation of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 by HCMV IE1-72 protein.** *Cell Res* 2011, 21:642-653.
37. Buchkovich NJ, Yu Y, Pierciey FJ, Jr., Alwine JC: **Human cytomegalovirus induces the endoplasmic reticulum chaperone BiP through increased transcription and activation of translation by using the BiP internal ribosome entry site.** *J Virol* 2010, 84:11479-11486.
38. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ: **A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel**

- bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 1998, **12**:1812-1824.
39. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D: IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002, **415**:92-96.
 40. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH: XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7448-7459.
 41. Tardif, K. D., Mori, K., Kaufman, R. J and Siddiqui, A. (2004). Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J of Biol Chemistry* 279, 17158-17164.
 42. Asselah, T., Bièche, I., Mansouri, A., Laurendeau, I., Cazals-Hatem, D., Feldmann, G., Bedossa, P., Paradis, V., Martinot-Peignoux, M., Lebrech, D., Guichard, C., Ogier-Denis, E., Vidaud, M., Tellier, Z., Soumelis, V., Marcellin, P. and Moreau, R. (2010). In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J of Pathol* 221, 264-274.
 43. McPherson S, Powell EE, Barrie HD, Clouston AD, McGuckin M, Jossion JR: No evidence of the unfolded protein response in patients with chronic Hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2011, **26**: 319-317
 44. Goodman, A. G., Smith, J. A., Balachandran, S., Perwitasari, O., Proll, S. C., Thomas, M. J., Korth. M. J., Barber, G. N., Schiff, L. A and Katze, M. G. (2007). The cellular protein P58^{IPK} regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism. *J of Virol* 81, 2221-2230.

45. Goodman, A. G., Fornek, J. L., Medigeschi, G. R., Perrone, L. A., Peng, X., Dyer, M. D., Proll, S. C., Knoblauch, S. E., Carter, V. S., Korth, M. J., Nelson, J. A., Tumpey, T. M and Katze, M. G. (2009). **P58^{IPK}: A novel CIDH member of the host innate defense response against pathogenic virus infection.** Plos One, 5: 1-13.

Rotavirus Infection Induces the Unfolded Protein Response of the Cell and Controls It through the Nonstructural Protein NSP3

Vicenta Trujillo-Alonso, Liliana Maruri-Avidal, Carlos F. Arias and Susana López
J. Virol. 2011, 85(23):12594. DOI: 10.1128/JVI.05620-11.
Published Ahead of Print 21 September 2011.

Updated information and services can be found at:
<http://jvi.asm.org/content/85/23/12594>

These include:

REFERENCES

This article cites 68 articles, 39 of which can be accessed free at: <http://jvi.asm.org/content/85/23/12594#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://jvi.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Rotavirus Infection Induces the Unfolded Protein Response of the Cell and Controls It through the Nonstructural Protein NSP3[∇]

Vicenta Trujillo-Alonso, Liliana Maruri-Avidal,[†] Carlos F. Arias, and Susana López*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received 6 July 2011/Accepted 13 September 2011

The unfolded protein response (UPR) is a cellular mechanism that is triggered in order to cope with the stress caused by the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). This response is initiated by the endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6), and PKR-like ER kinase, which increase the expression of the genes involved in the folding and degradation processes and decrease the protein input into the ER by inhibiting translation. It has been shown that viruses both induce and manipulate the UPR in order to protect the host cells from an ER stress-mediated death, thus permitting the translation of viral proteins and the efficient replication of the virus. To understand the cellular events that occur during the rotavirus replication cycle, we examined the activation of the three UPR arms following infection, using luciferase reporters driven by promoters of the ER stress-responsive genes and real-time reverse transcription-PCR to determine the levels of the stress-induced mRNAs. Our findings indicated that during rotavirus infection two of the three arms of the UPR (IRE1 and ATF6) become activated; however, these pathways are interrupted at the translational level by the general inhibition of protein synthesis caused by NSP3. This response seems to be triggered by more than one viral protein synthesized during the replication of the virus, but not by the viral double-stranded RNA (dsRNA), since cells transfected with psoralen-inactivated virions, or with naked viral dsRNA, did not induce UPR.

Eukaryotic cells encounter a range of physiological and environmental stressful conditions that require adaptive responses in gene expression; these include temperature changes, nutrient limitation, chemical insults, oxidative stress, hypoxia, and virus infection, among others. Exposure of cells to stress elicits adaptive responses that require the coordinated expression of stress response genes which affect survival, cell cycle progression, differentiation, and apoptosis (63). The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle that integrates signals from throughout the cell to orchestrate a coordinated response in these situations (33). It is the ER where the folding of proteins destined for both intracellular organelles and the cell surface takes place (5). Accumulation of misfolded proteins in the ER causes stress and leads to activation of a coordinated adaptive program called the unfolded protein response (UPR) (reviewed in references 17 and 26). The function of the UPR is to deal with unfolded proteins by upregulating the expression of chaperone proteins and degradation factors to refold or eliminate misfolded proteins and to reduce incoming protein traffic into the ER by attenuation of translation (50). An important function of the UPR is to reduce the demand on the protein-folding machinery to protect cells from stress. Failure to alleviate the ER stress leads to activation of

apoptotic pathways and cell death (25). Three ER-resident transmembrane proteins are activated in response to ER stress: the PKR-like ER kinase (PERK), the activating transcription factor 6 (ATF6), and inositol-requiring enzyme 1 (IRE1). It is proposed that under normal conditions the ER chaperone GRP78/BiP is bound to the luminal domain of each sensor. When misfolded proteins accumulate in the ER, GRP78 binds these proteins and releases the sensors. Upon release, PERK and IRE1 homodimerize, causing autophosphorylation and activation, while released ATF6 relocates to the Golgi complex, where it is cleaved and activated. Once activated, PERK (a eukaryotic initiation factor 2 [eIF2] kinase) phosphorylates the alpha-subunit of eIF2 (eIF2 α) at serine 51. Phosphorylated eIF2 α inhibits global translation (48) and stimulates the translation of ATF4 (32), which in turn transcriptionally activates UPR-responsive genes encoding proteins that ameliorate the ER stress (19, 20). The CCAT/enhancer binding protein (CHOP) is a target gene of ATF4 that, depending on the strength or duration of the stress, can function as a proapoptotic or prosurvival transcription factor (21, 34, 49). Both transcription factors, ATF4 and CHOP, can induce the transcription of GADD34, a protein that interacts with protein phosphatase 1 (PP1) to dephosphorylate eIF2 α , resulting in a negative feedback loop that recovers protein synthesis and allows the translation of stress-induced transcripts (40). When ATF6 is cleaved in the Golgi apparatus, one of its cleavage products becomes an active transcription factor that promotes the transcription of chaperone genes. Finally, upon dimerization of IRE1, it autophosphorylates and mediates the removal of an intron from X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA. The spliced form of XBP1 encodes a transcription factor that activates the transcription of genes encoding chap-

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

[†] Present address: Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 33 North Drive, Building 33, Bethesda, MD 20892.

[∇] Published ahead of print on 21 September 2011.

erones and proteins involved in ER stress-associated protein degradation (ERAD) (reviewed in references 17, 26, and 50).

Rotaviruses are one of the most important causes of viral diarrhea in infants and young children, accounting for approximately 500,000 deaths annually around the world (42). These nonenveloped viruses are formed by three concentric layers of proteins that enclose a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA). Each genomic segment, with the exception of segment 11, encodes one viral protein, resulting in a total of six structural (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural proteins (NSP1 to NSP6). The nucleocapsid of the virion is formed by VP2 and also contains the RNA-dependent RNA polymerase VP1 and the guanylyltransferase/methylase VP3. The middle layer is composed of VP6, while the outer layer is formed by VP7 and VP4 (reviewed in reference 8).

Soon after cell entry, the virus loses the two outer surface proteins, yielding a double-layered particle (DLP) that is transcriptionally active. RNA replication and assembly of the new DLPs take place in structures known as viroplasm. Subsequently, DLPs bud into the ER through their interaction with NSP4, a viral transmembrane ER glycoprotein. During the budding process the immature virion acquires VP4, glycoprotein VP7, and a transient lipid envelope. Once inside the ER, the lipid envelope and NSP4 are lost by an ill-defined mechanism. Mature virions are then released from MA104 cells by cell lysis (8).

Several viruses have been shown to induce ER stress and UPR signaling (23, 43, 56). However, viruses that induce ER stress must face the consequences of activating the UPR. The general arrest of protein synthesis caused by phosphorylation of eIF2 α must be dealt with in order to express viral and cellular proteins essential for the replication cycle of the virus, while the overexpression of chaperones and the regulation of the redox environment must be beneficial. Thus, it has been proposed that viruses induce mechanisms that modulate the UPR, keeping the beneficial aspects while suppressing the deleterious ones (23). We previously found that during rotavirus infection the mRNA levels of some chaperones, including that of GRP78, are increased (L. Maruri-Avidal, unpublished results), eIF2 α becomes phosphorylated, and there is a general shutoff of cell protein synthesis (38). These results suggest that rotavirus infection causes stress in the ER. However, it has not been directly demonstrated that rotavirus induces a UPR in infected cells and if it is able to control it. In this study we characterized the three pathways of the UPR in rotavirus-infected MA104 cells and compared their activation with cells treated with thapsigargin, a known ER stress inducer. We found that in rhesus rotavirus (RRV)-infected cells the splicing of XBP1 mRNA mediated by IRE1 takes place. Furthermore, the infection induced increased levels of GRP78, GADD34, and CHOP mRNAs, indicating the transcriptional activation of UPR. Interestingly, we found that this ER-mediated signaling was suppressed at the translational level by the viral nonstructural protein NSP3.

MATERIALS AND METHODS

Cells, viruses, and antibodies. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in advanced Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 4% fetal bovine serum

TABLE 1. Oligonucleotide sequences used for qRT-PCR assays to detect gene expression

Gene	Primer sequence (5'→3')	
	Forward	Reverse
GRP78	ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	TGCCGTAGGCTCGTTGATG
CHOP	GCTCTGATTGACCGAATGGT	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
GADD34	GAGGGCAGGGAAGTCAATTT	TCCTCCCCTGGGTTCTTATC
EDEM	CTCCTTACCAGGCAACCAA	GGCGTACCCACACTTGACTT
P58	CATGAAAACAGAGCAAGCA	TCAACAGGCTTGTGCTCCTT
Firefly luciferase	GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT	ACACCTGCGTCGAAGATGT
Renilla luciferase	GTGGCCACATATTGAGCCA GT	CCATTACCAGATTGCGCTGA
GAPDH	ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA	CCTGTCTACCACCTTCTTGAT

(FBS) and was used for all experiments carried out in this work. Rhesus rotavirus was obtained from H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA, and was propagated in MA104 cells as described previously (13). For infection, RRV was activated with trypsin (10 μ g/ml; Gibco, BRL) for 30 min at 37°C. To prepare UV-psoralen-inactivated virus, an RRV lysate was mixed with psoralen to a final concentration of 40 μ g/ml and was exposed to a UV lamp for 1 h on ice. To verify the inactivation, the titer of the UV-psoralen-treated virus was determined in an immunoperoxidase focus assay, and the integrity of the viral particles was determined by a hemagglutination assay. Rabbit hyperimmune sera to rotavirus particles, and to NSP3, were produced in our laboratory and have been described previously (10). The secondary antibody used was horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis of XBP1. ER stress-induced processing of XBP1 mRNA was evaluated as previously described (51). Total RNA was isolated from RRV-infected cells at different times postinfection by using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as indicated by the manufacturer. cDNA was reverse transcribed from 1 μ g of total RNA using the Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) reverse transcriptase (New England BioLabs) and amplified with Vent polymerase (New England BioLabs) using the pair of specific primers for mRNA XBP1 (5'-CTGGAACAGCAAGTGGTAGA-3' and 5'-CTGGGTCCTTCTGGGTAG-3'). Amplified fragments of 398 bp and 424 bp, representing the spliced (XBP1s) and unspliced (XBP1u) forms, respectively, were separated in 6% polyacrylamide-Tris-borate-EDTA (TBE; 20 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA; pH 8), visualized by ethidium bromide staining, and detected using a Typhoon TRIO imager (Amersham Biosciences).

Real-time RT-PCR analysis. Confluent MA104 cells in 48-well plates were infected with RRV and harvested at different time points with TRIzol reagent (Invitrogen). Total RNA was purified and treated with RNA-free DNase (Roche) to eliminate possible DNA contamination. The level of stress-responsive mRNAs was determined by one-step real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) as previously reported (35). The primers used for the amplifications are shown in Table 1. Quantitative analysis of data was performed using Prism 7000 analysis software (Applied Biosystems). To quantify the changes in gene expression, the change in threshold cycle (ΔC_T) was used to calculate relative fold changes normalized against the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) control (31).

Plasmids. The GRP78-luc reporter construct was provided by K. Mori, Kyoto University, Kyoto, Japan. GRP78-luc contains the region between nucleotides (nt) -304 and +34 of the human GRP78 promoter. This promoter has multiple copies of the ER stress response element (ERSE) and is fused to the firefly luciferase coding region (66). The CHOP-luc reporter plasmid contains the region from nt -644 to +91 of the human CHOP promoter fused to the firefly luciferase coding region and was provided by N. S. Wong, University of Hong Kong (27). The 5 \times ATF6-luc plasmid, which contains five copies in tandem of the ATF6 consensus binding site upstream of the firefly luciferase coding region, under the c-fos minimal promoter, was kindly provided by R. Prywes, Columbia University, New York, NY (61). Construct mUTR-ATF4-luc, which contains the 5'-untranslated region (UTR) of the mouse ATF4 mRNA fused to the coding region of firefly luciferase driven by a thymidine kinase promoter, was provided by D. Ron, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom (18). The pRL-TK plasmid (Promega), containing the *Renilla* luciferase coding region under the thymidine kinase promoter, was used as an internal control to normalize for transfection efficiency. The activity of the *Renilla* luciferase was not significantly modified in rotavirus-infected cells (data not shown).

Transfection and reporter assays. MA104 cells grown on a 48-well plate were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufactur-

er's instructions. Reporter plasmids GRP78-luc and CHOP-luc were used at 250 ng/well, while mATF4-UTR-luc and 5×ATF6-luc were used at 1 µg/well. All four constructs were cotransfected with the control plasmid pRL-TK (25 ng/well). At 8 h posttransfection (hpt), the medium was replaced with DMEM–2% FBS, and 24 h later the cells were infected with RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 10 and harvested at different times postinfection. Cellular lysates were assayed in duplicate for firefly and *Renilla* luciferase activities using the dual-luciferase kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. In each assay, the firefly luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity obtained in the same well and was expressed as a percentage of the mock-infected or control-treated cells (which were set as 100% at each time point).

Cotransfection of siRNAs and plasmids. Small interfering RNAs (siRNAs) were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO); the sequences of the siRNAs used in this work have been previously reported (38). As an irrelevant control, an siRNA directed to the green fluorescent protein was used. Cotransfection of siRNAs and reporter plasmids into MA104 cells was performed using a reverse transfection method previously described (15). Briefly, 15 µl of Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) was diluted in 1 ml of MEM and incubated for 10 min at room temperature. Ninety microliters of this mixture was added to a well of a 48-well plate containing a mix of 200 pmol/ml of the siRNA and the reporter plasmids. After an incubation of 20 min at room temperature, 200 µl of a single-cell suspension of 1.5×10^5 MA104 cells/ml was added to each well, and the cells were incubated at 37°C for 24 h. The transfection mixture was removed, and then the cells were washed twice with DMEM and infected with RRV at an MOI of 10 or treated with thapsigargin (400 nM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Nine hours postinfection (hpi) or posttreatment, cells were lysed and assayed for luciferase activity and immunoblotting. The relative induction levels were calculated based on the values obtained in mock-infected cells transfected with the irrelevant siRNA, which were set as 100% at each time point.

RNA transfection. To transfect dsRNA, the cells previously transfected for 24 h with the reporter plasmids were incubated for 1 h at 37°C with MEM containing Lipofectamine 2000 (40 µg/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) and 5 µg/ml of synthetic poly(I · C) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or 5 µg/ml purified viral dsRNA. After this time, the transfection mixture was replaced with DMEM supplemented with 4% FBS, and cells were incubated for different times before harvesting.

Radiolabeling of proteins. Cells grown in 48-well plates were mock transfected or transfected with synthetic poly(I · C) (5 µg/ml) or purified viral dsRNA (5 µg/ml) for 9 h as previously mentioned. Before harvesting, the medium was replaced with MEM without methionine, supplemented with 25 µCi/ml of Easy Tag Express ³⁵S labeling mix (Dupont NEN, Boston, MA) and incubated for 30 min at 37°C. Cells were lysed as indicated below, and samples were resolved by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by autoradiography.

Immunoblot analysis. Cells were incubated for 15 min at 4°C in the lysis buffer of the dual-luciferase kit (Promega, Madison, WI) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche, Indianapolis, IN). The lysates were diluted in Laemmli sample buffer, denatured by boiling for 5 min, subjected to 10% SDS-PAGE, and transferred to Immobilon NC membranes (Millipore, Billerica, MA). After incubation with blocking solution (5% nonfat milk, 0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline [PBS]) for 1 h at room temperature, the membranes were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution for 1 h at room temperature or overnight at 4°C. The membranes were rinsed with PBS-Tween 20, and bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody and the Western Lightning system (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

Statistics. Significant differences between the experimental conditions were determined using an analysis of variance (ANOVA), and a *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Activation of the XBP1/IRE1 pathway in rotavirus-infected cells. IRE1 is a bifunctional enzyme with both serine/threonine kinase and endoribonuclease activities (57). Activated IRE1 cleaves a 26-nt intron from the primary XBP1 transcript (58). This unconventional splicing occurs in the cytoplasm and causes a translational frameshift at XBP1 mRNA that stimulates its translation, and the spliced XBP1 mRNA encodes an active XBP1 factor that is involved in the transcriptional in-

duction of genes encoding ER chaperones, such as GRP78 and GRP94, as well as genes involved in the ER stress-associated protein degradation pathway, like EDEM (degradation-enhancing mannosidase-like protein) and P58, the negative regulator of kinases PERK and PKR (28).

To determine if during the replication cycle of rotavirus the XBP1/IRE1 arm of the UPR becomes activated, MA104 cells were infected with RRV, and at various times postinfection total mRNA was isolated. RT-PCR was performed using primers flanking the XBP1 mRNA splice site, and the PCR products were resolved by PAGE and visualized by ethidium bromide staining (Fig. 1A). A pharmacological inducer of ER stress, thapsigargin, was used as a positive control in all experiments. In mock-infected cells the predominant RT-PCR product found represented the unspliced form of the XBP1 transcript (424 nt; referred to as XBP1u), while in thapsigargin-treated cells the predominant form was the spliced transcript (398 nt; referred to as XBPs). During the time course of infection, a gradual splicing of XBP1 mRNA could be observed (Fig. 1A), suggesting that the XBP1/IRE1 pathway became activated. The progression of rotavirus infection was followed at the same time by autoradiography of the cell lysates, which were labeled with ³⁵S for 30 min prior to harvesting at the different times postinfection (Fig. 1B). To determine if the activation of this pathway was mediated by the early interaction of the virus with the host cell, rotavirus particles were inactivated by a psoralen-UV irradiation treatment, which blocks viral RNA transcription, genome replication, and protein synthesis but has no effect on receptor binding and subsequent entry of the virus into the cell (11). Cells were incubated for 9 h with inactivated RRV particles, and the splicing of XBP1 transcript was analyzed (Fig. 1A, lane iRRV). In this case, the predominant RT-PCR product found was the unspliced XBP1, suggesting that the activation of IRE1 that leads to the splicing of XBP1 mRNA depends on viral replication rather than virus entry.

Next, the mRNA levels of EDEM and P58, two genes whose transcription is activated by XBP1, were measured by qRT-PCR in rotavirus-infected cells. In contrast to the treatment with thapsigargin, which resulted in 8-fold and 5-fold increases in the levels of EDEM and P58 mRNAs, respectively, no significant changes in the level of these transcripts was detected at any time point postinfection (Fig. 1C). These results indicate that even though the mRNA of XBP1 was spliced in rotavirus-infected cells, either the transcriptional activity or the translation of XBP1 was blocked.

Analysis of the ATF6 pathway in rotavirus-infected cells. Upon ER stress, ATF6 dissociates from GRP78 and moves to the Golgi apparatus, where it is cleaved by the site 1 and site 2 proteases (S1P and S2P), thus releasing the active transcription factor p50ATF6, which is translocated to the nucleus and activates the transcription of mRNAs that code for the ER-resident chaperones GRP78 and GRP94 as well as for the transcription factors CHOP and XBP1, among others (52). To study if the ATF6 pathway is activated during rotavirus infection, the activities of two luciferase reporter constructs were determined in MA104 cells infected with RRV or treated with thapsigargin. The luciferase reporters used were 5×ATF6-luc, a firefly luciferase reporter that contains five copies of the ATF6 consensus binding site upstream of the luciferase gene,

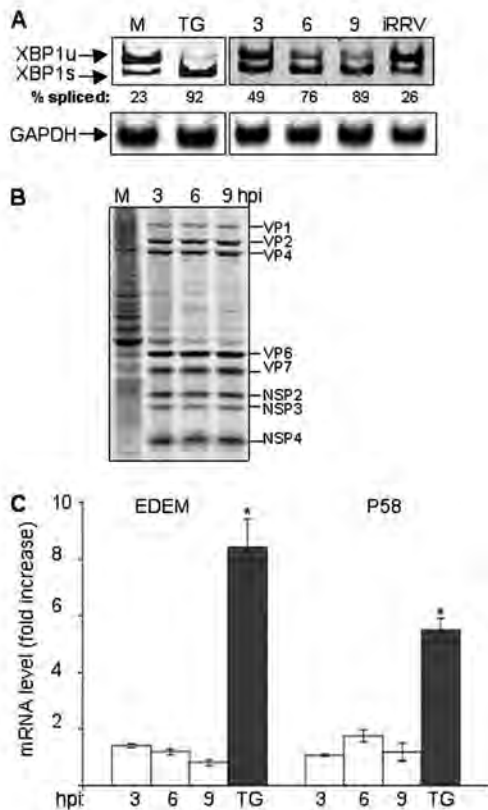


FIG. 1. Rotavirus infection induces the splicing of XBP1 mRNA but does not increase the transcription of XBP1 target genes. MA104 cells were either treated with thapsigargin (400 nM) for 9 h, infected with psoralen-inactivated virus (iRRV) for 9 h, or infected with RRV at an MOI of 10 and harvested at the indicated time points. (A) Total RNA isolated from infected or thapsigargin (TG)-treated cells was used for the amplification of XBP1 transcripts by RT-PCR using primers flanking the XBP1 splice site. M, mock-infected cells. The PCR products were resolved by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining as described in Materials and Methods. The XBP1u and XBP1s forms are shown. The percent spliced refers to the amount of XBP1s relative to the total amount of XBP1 (XBP1u + XBP1s) present under each condition. GAPDH mRNA was amplified by RT-PCR as an RNA loading control under each condition. (B) MA104 cells were mock infected (M) or infected with RRV at an MOI of 10 for the indicated times and labeled with Easy Tag Express ^{35}S labeling mix for 30 min before harvesting. Labeled proteins were resolved by SDS-PAGE and autoradiography. (C) Total RNA extracted from infected or TG-treated cells was used to quantitate the level of EDEM and P58 mRNA by qRT-PCR. Results are expressed as the fold increase relative to mock-infected controls (set at 1.0) at each time point. The arithmetic mean \pm the standard error for three independent experiments performed in triplicate is shown. *, $P < 0.05$ by ANOVA.

and plasmid GRP78-luc, a firefly luciferase reporter driven by the promoter of the human GRP78 gene. These two plasmids have been extensively used to monitor the activation of UPR (61, 66). Cells transfected with either of these two plasmids were infected with RRV, harvested at different times postinfection, and the luciferase activity was measured. We found that under these conditions there was not a significant increase in the luciferase activity driven from either of the two reporters employed, compared with the activity detected in mock-infected cells (Fig. 2A). In contrast, treatment with

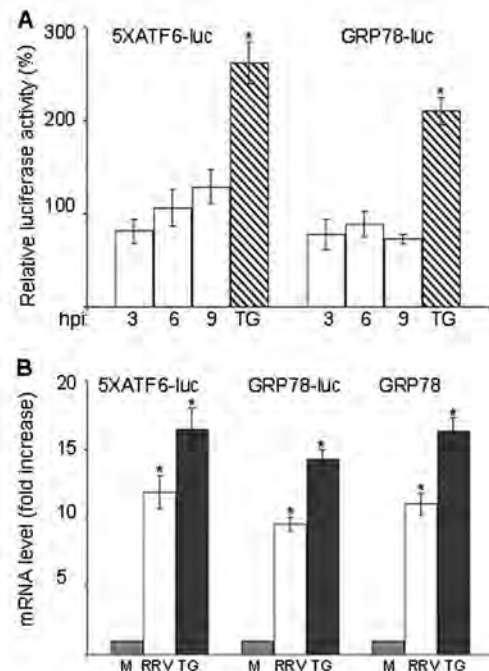


FIG. 2. Rotavirus infection activates the ATF6 pathway but prevents the expression of its target genes. MA104 cells were transfected for 24 h with either 5XATF6-luc or GRP78-luc reporter plasmids. In each case, pRL-TK plasmid encoding *Renilla* luciferase was cotransfected and used for normalization of transfection efficiency. Cells were then infected with rotavirus at an MOI of 10 or treated with thapsigargin (TG) for 9 h. (A) At the indicated time points, cell lysates were harvested for a dual-luciferase assay as described in Materials and Methods. The ratio of firefly to *Renilla* luciferase activities was expressed as a percentage relative to activity in uninfected cells, which was set as 100%. (B) Total RNA was extracted from cells cotransfected with plasmids, or from nontransfected cells, that were either infected or treated with TG for 9 h and used to quantitate the level of firefly and *Renilla* luciferase mRNAs in the case of the plasmid-transfected cells or the level of endogenous GRP78 mRNA, by qRT-PCR analysis. The mRNA level of firefly luciferase was normalized to the level of *Renilla* luciferase mRNA, and the level of GRP78 mRNA was normalized to that of GAPDH mRNA. The fold increase shown is relative to the values obtained in mock-infected or mock-treated cells (set as 1.0). The results represent the means \pm standard errors for three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between mock- and thapsigargin-treated cells, determined by ANOVA ($P < 0.05$).

thapsigargin strongly induced the luciferase activity from both reporter constructs. These results suggested that the ATF6 pathway does not become activated during rotavirus infection.

To confirm that the ATF6 pathway was not activated in rotavirus-infected cells, the levels of firefly luciferase mRNA in cells previously transfected with reporters 5XATF6-luc or grp78-luc were measured by qRT-PCR. Similarly, the level of endogenous GRP78 mRNA was measured in rotavirus-infected or thapsigargin-treated cells. In contrast to our previous findings in the luciferase activity assays (Fig. 2A), we found a 10-fold increase in the level of both luciferase transcripts and GRP78 transcripts, compared to the levels of these two mRNAs obtained in mock-infected cells (Fig. 2B). Thapsigargin treatment of the cells resulted in a 15-fold increase in the levels of luciferase and GRP78 mRNAs, compared to control non-

treated cells. Taken together, these results suggest that rotavirus infection induces the activation of the ATF6 pathway, as indicated by the upregulation of transcription of the luciferase reporter gene placed under the control of ATF6 elements, as well as that of GRP78. However, there seems to have been a block in the translation of these mRNAs, as judged by the lack of the reporter luciferase activity in infected cells.

Translation of ATF4, CHOP, and GADD34 in rotavirus-infected cells. Another arm of the UPR is the phosphorylation of eIF2 α by PERK, which results in a dramatic inhibition of protein translation. Under these restrictive conditions, in which there is little eIF2 α available, the translation of a group of cellular proteins is stimulated. Such is the case for ATF4, CHOP, and GADD34 (30, 41, 59). Since eIF2 α is phosphorylated in rotavirus-infected cells (38), we analyzed if these factors were selectively translated. For this, MA104 cells were transfected either with the construct mUTR-ATF4-luc, which contains the 5'-UTR of the mouse ATF4 mRNA fused to the coding region of the firefly luciferase, or with the construct CHOP-luc, a luciferase reporter driven by the CHOP promoter. The cells were then infected with RRV and harvested at different times postinfection to measure the luciferase reporter activity. We found that, even though eIF2 α is phosphorylated throughout the replication cycle of the virus (38, 47), the luciferase activities from ATF4-UTR-luc or CHOP-luc constructs did not change over the course of infection relative to the activity detected in mock-infected cells, whereas addition of thapsigargin did result in a significant increase in the luciferase activities of both reporters (Fig. 3A). These results suggest that in the rotavirus-infected cells neither ATF4 nor CHOP was translated.

To confirm the lack of ATF4 activity, the levels of GADD34 and CHOP mRNAs were quantitated by qRT-PCR. We found that, in contrast to the results obtained with the CHOP-luciferase reporter assay (Fig. 3A), rotavirus infection resulted in a gradual increase in the level of CHOP mRNA over the 9-h time course of infection. In the case of GADD34 mRNA, the increase became significant at 6 h postinfection, and at 9 h postinfection it attained a level equivalent to that seen in thapsigargin-treated cells (Fig. 3B), indicating the upregulation of these mRNAs in rotavirus-infected cells. Taken together, these results suggest that the infection of MA104 cells with rotavirus causes an ER stress, as indicated by the elevated levels of GRP78, CHOP, and GADD34 mRNAs observed in infected cells. However, apparently the UPR pathways activated in response to the infection were modulated at the translational level, since the expression of the luciferase reporters used was prevented.

Translation of the UPR genes in rotavirus-infected cells is prevented by NSP3. It has been previously shown that NSP3 prevents the translation of poly(A)-containing cellular genes by interacting with eIF4G at the same place where poly(A) binding protein binds (12, 44, 45), and in a previous work we showed that silencing the expression of NSP3 did not affect the translation of the viral proteins (38). To determine if this viral protein was involved in preventing the translation of the UPR genes, the expression of NSP3 was silenced by RNA interference (RNAi) in rotavirus-infected cells. For this, MA104 cells were cotransfected with an siRNA directed to NSP3 together with each of the luciferase reporters previously described; 24 h

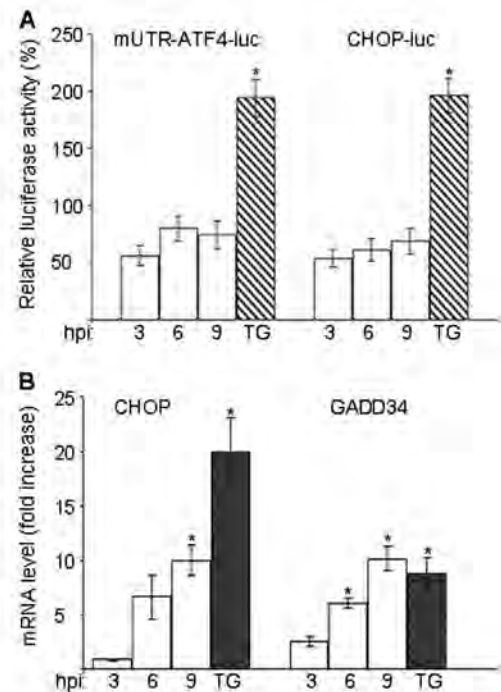


FIG. 3. Rotavirus infection does not activate ATF4 translation, but it induces GADD34 and CHOP transcription. (A) MA104 cells were transfected for 24 h with plasmid mUTR-ATF4-luc, which contains the 5'-UTR of the mouse ATF4 mRNA fused to the coding region of firefly luciferase, or with construct CHOP-luc, a firefly luciferase reporter driven by the CHOP promoter. Each reporter was cotransfected with plasmid pRL-TK. Cells were then infected with rotavirus at an MOI of 10 or treated with thapsigargin (TG) for 9 h. At the indicated time points, cell lysates were harvested for a dual-luciferase assay as described in Materials and Methods. The ratio of luciferase activities was expressed as a percentage relative to the value obtained in uninfected cells, which was set as 100%. Values represent the means \pm standard errors for three independent experiments. (B) Total RNA isolated from RRV-infected or TG-treated cells was analyzed by qRT-PCR using primers specific for GADD34 or CHOP mRNAs, and their levels were normalized to the level of GAPDH mRNA. The fold increase is relative to the level of mRNA detected in mock-infected controls (set as 1.0) at each time point. The asterisks indicate significant differences between mock- and TG-treated cells as determined by ANOVA ($P < 0.05$).

later the cells were infected with RRV, and 9 hpi the luciferase activity was determined. As a control, MA104 cells were transfected with an irrelevant siRNA. The siRNA directed to NSP3 efficiently knocked down the expression of this protein in infected cells, as shown by a representative Western blot assay (Fig. 4A, inset). Silencing NSP3 resulted in increased luciferase activities from the 5 \times ATF6-luc and GRP78-luc reporters that were similar to that found in cells treated with thapsigargin and 3- to 4-fold higher than the luciferase activity detected in infected cells transfected with the control siRNA (Fig. 4A), suggesting that in the absence of NSP3, the activation and subsequent binding of the endogenous ATF6 to its target sequence present in the 5 \times ATF6-luc construct and the upregulation of the GRP78 promoter took place in these cells. We also found that under these same conditions the expression of the translational reporter mUTR-ATF4-luc did not change, whereas there was a 2-fold increase in the luciferase activity

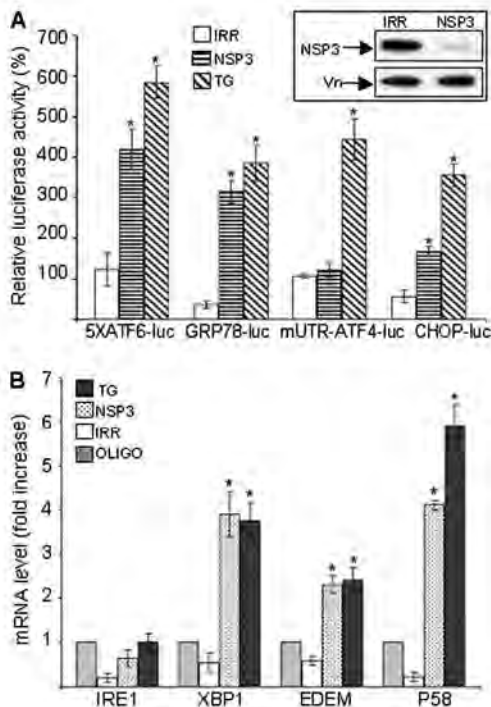


FIG. 4. Rotavirus NSP3 protein prevents the translation of ER stress genes in rotavirus-infected cells. (A) MA104 cells were cotransfected with 5XATF6-luc, GRP78-luc, mUTR-ATF4-luc, or CHOP-luc plasmids and with an siRNA directed either to NSP3 or an irrelevant siRNA for 24 h. Cells were then infected with rotavirus at an MOI of 10 or treated with thapsigargin (TG) for 9 h. The luciferase activity in each lysate was determined in a dual-luciferase assay as described in Materials and Methods. Results show the luciferase activity induction relative to that in mock-infected cells transfected with the irrelevant siRNA, which was set as 100%. Values represent the means \pm standard errors for three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between mock- and rotavirus-infected cells, or TG-treated cells, as determined by ANOVA ($P < 0.05$). (Inset) In parallel wells, cells treated as described here were lysed 9 h postinfection, and the amount of NSP3 present in the lysates was verified by Western blotting using a rabbit anti-NSP3 serum; vimentin (Vn) was immunostained as a loading control. (B) Cells were transfected with an siRNA directed to NSP3 or with an irrelevant siRNA (IRR) for 24 h and were then infected with RRV at an MOI of 10 or treated with thapsigargin (TG) for 9 h. Cells were lysed, and total RNA was extracted and used for qRT-PCR assays using primers specific for IRE1, XBP1, EDEM, or P58 mRNAs, and their levels were normalized to the level of GAPDH mRNA. The fold increase shown is relative to the level of mRNA detected in mock-infected cells treated only with Oligofectamine (OLIGO; set as 1.0). Values represent the means \pm standard errors for three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between mock- and rotavirus-infected or TG-treated cells, determined by an ANOVA ($P < 0.05$).

from the CHOP-luc construct, suggesting an ATF4-independent activation of the CHOP promoter, which correlated with the increased level of CHOP mRNA previously detected by quantitative RT-PCR (Fig. 3B). To discard the possibility that NSP3 could be interfering with the activity of luciferase, rather than on its translation, we performed a Western blot assay using an antiluciferase antibody in cells transfected with the GRP78-luc reporter that were infected or not with rotavirus, and we found that the absence of luciferase activity in rotavi-

rus-infected cells correlated with the absence of the protein, based on Western blotting (results not shown).

Since the splicing of XBP1 mRNA, but not the transcriptional activity of this factor, was detected in rotavirus-infected cells (Fig. 1A), we suspected that the inhibition of XBP1 activity could also be at the translational level and that NSP3 could be involved. Thus, we quantitated by qRT-PCR the mRNA level of EDEM and P58 (whose synthesis is under the control of XBP1) in NSP3-silenced RRV-infected cells. Since the XBP1 gene also has an ERSE sequence that can be recognized by both ATF6 and XBP1 itself (66), the level of XBP1 mRNA was also determined. As a control, IRE1 mRNA levels were also quantitated. We found that in cells where the expression of NSP3 was silenced, the level of all XBP1 target genes tested increased to levels similar to those observed in thapsigargin-treated cells: XBP1 mRNA increased more than 3-fold, whereas EDEM and P58 mRNAs increased 2- and 4-fold, respectively (Fig. 4B). As expected, the level of IRE1 mRNA did not change significantly under these conditions. These findings indirectly suggested that even though the primary transcript of XBP1 is spliced, it is not translated in rotavirus-infected cells, most likely due to the presence of NSP3, and thus the transcriptional activity of this factor is absent in infected cells. Overall, our data indicate that the infection of MA104 cells with rotavirus causes an ER stress that leads to the activation of the UPR. However, this response seems to be modulated at the translational level by the viral nonstructural protein NSP3.

Transfection of double-stranded RNA into cells does not induce UPR. PKR is considered a component of the ER stress-mediated pathway, since treatment of cells with ER stress inducers renders PKR active, suggesting a role for this kinase in the ER stress-mediated signaling (39). As previously mentioned, we recently reported that PKR is the kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus-infected cells and that viral dsRNA is its most likely activator (47). To determine if the activation of PKR contributed to the ER stress response induced by rotavirus infection, we transfected cells either with purified viral dsRNA or with a synthetic dsRNA [poly(I · C)], a known activator of PKR, and analyzed which of the UPR pathways became activated under these conditions. Again, thapsigargin was used as a positive UPR inducer.

Since the phosphorylation of eIF2 by PKR results in a severe shutoff of cellular protein synthesis, the activation of PKR in poly(I · C)-transfected cells was indirectly monitored following the metabolic labeling of proteins. As expected, in cells transfected with poly(I · C), there was a strong shutoff of cellular protein synthesis, as judged by the poor incorporation of ^{35}S in proteins (Fig. 5A). The splicing of XBP1 mRNA mediated by IRE1 was then determined by RT-PCR in cells transfected with either viral dsRNA or poly(I · C) or in cells treated with thapsigargin. We found that there was a weak but consistent signal of the spliced form of XBP1 in the poly(I · C)- and dsRNA-transfected cells at all times tested; however, this slight processing was more likely due to the stress caused by the transfection reagent, since the same amount of the XBP1s form was found in cells treated with the transfection reagent alone (Fig. 5B, lane T). In contrast, in thapsigargin-treated cells there was a gradual increase in the production of the XBP1s form and a corresponding decreased amount of the unspliced form.

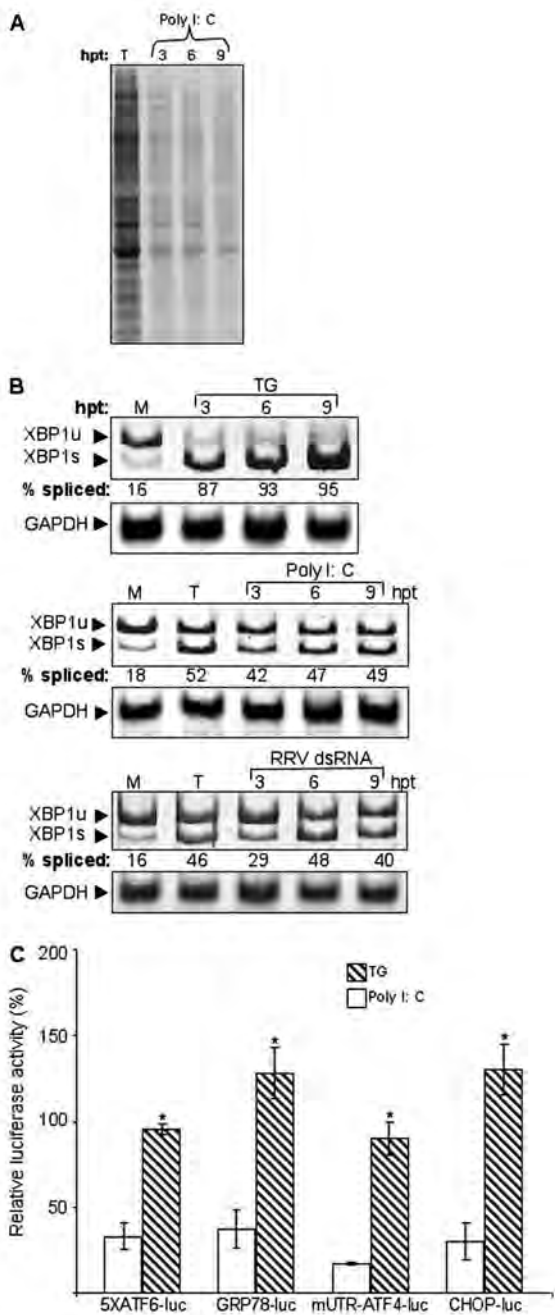


FIG. 5. dsRNA activation of PKR does not induce ER stress gene expression. (A) MA104 cells were transfected with poly(I·C) (5 μ g/ml) for the indicated times and labeled with Easy Tag Express 35 S labeling mix for 30 min before harvesting. Labeled proteins were resolved by SDS-PAGE and autoradiography. (B) Total RNA from poly(I·C)-transfected cells, viral dsRNA-transfected cells (5 μ g/ml), or thapsigargin-treated cells was harvested at the indicated time points and used for the amplification of XBP1 transcripts by RT-PCR using primers flanking the XBP1 splice site. The PCR products were resolved by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining as described in Materials and Methods. The XBP1u and XBP1s forms are shown. Under each condition, GAPDH mRNA was amplified by RT-PCR as a loading control. M, mock-infected or mock-treated cells; T, cells treated with the transfectant. (C) MA104 cells were transfected for 24 h with plasmids 5XATF6-luc, GRP78-luc, mUTR-ATF4-luc, or CHOP-luc. After 24 h cells were transfected with poly(I·C) (5 μ g/ml) or treated with thapsigargin (400 nM) and harvested 9 h posttreatment. The luciferase activity in each lysate was

Next, the expression levels of the ER stress reporters in cells transfected with poly(I·C) were evaluated. The luciferase activity from the four reporters tested was not affected by transfection of the synthetic dsRNA at any time analyzed (only shown for 9 hpt), while thapsigargin increased significantly the luciferase activity from all constructs (Fig. 5C); similar results were obtained using purified viral dsRNA (data not shown), suggesting that neither the dsRNA nor the poly(I·C) *per se*, were responsible for the activation of the UPR. Interestingly, similar to our observations in rotavirus-infected cells, the transfection of dsRNA did not result in the upregulation of the expression of ATF4, despite the fact that dsRNA treatment of the cells induces the phosphorylation of eIF2 α in transfected cells (data not shown) (47), suggesting that the phosphorylation of eIF2 α might not be the only requirement to activate the translation of ATF4 in MA104 cells.

Several viral proteins are involved in the induction of ER stress in rotavirus-infected cells. After discarding dsRNA as the main elicitor of UPR in rotavirus-infected cells and to identify the viral protein(s) responsible for inducing ER stress, we silenced the expression of each viral protein by RNA interference and quantitated by qRT-PCR the level of GRP78 mRNA as an indicator of ER stress. For this, MA104 cells were transfected with siRNAs directed to each viral protein for 24 h and then infected with rotavirus. Nine hours postinfection cells were harvested and total RNA was obtained for qRT-PCR, or the cells were metabolically labeled with 35 S for 30 min prior to lysis. The knockdown of rotavirus proteins was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 6A and B), by qRT-PCR analysis (for NSP1 [data not shown]), or by Western blotting for NSP5 (Fig. 6C). As shown, the expression of the rotavirus proteins was significantly reduced (Fig. 6A, B, and C). When the level of GRP78 mRNA was quantitated under these conditions and compared to its level in mock-infected cells, it was found that there was an increase of about 10-fold in the amount of GRP78 mRNA in infected cells transfected with an irrelevant siRNA (as previously observed [Fig. 2B]), while in cells where the expression of VP1, VP2, VP6, and NSP5 was silenced, the level of GRP78 mRNA was not induced, suggesting that these viral proteins could participate in the induction of ER stress (Fig. 6B). The knockdown of VP3, VP4, NSP1, and NSP2 resulted in different degrees of ER stress, as indicated by a slight increase in the level of GRP78 mRNA, but was clearly lower than that observed in a control infection. In the absence of NSP3, the level of GRP78 mRNA increased to a level similar to the level detected during the infection. Interestingly, neither VP7 nor NSP4, the two viral glycoproteins, were apparently involved in the induction of ER stress, since when knocked down the level of GRP78 mRNA increased 5 to 7 times above that in the control mock-infected cells.

determined in a dual-luciferase assay as described in Materials and Methods. Results show the luciferase activity induction relative to that in nontransfected cells treated only with the transfectant, which was set to zero. Values represent the means \pm standard errors for three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between mock- and TG-treated cells, determined by an ANOVA ($P < 0.05$).

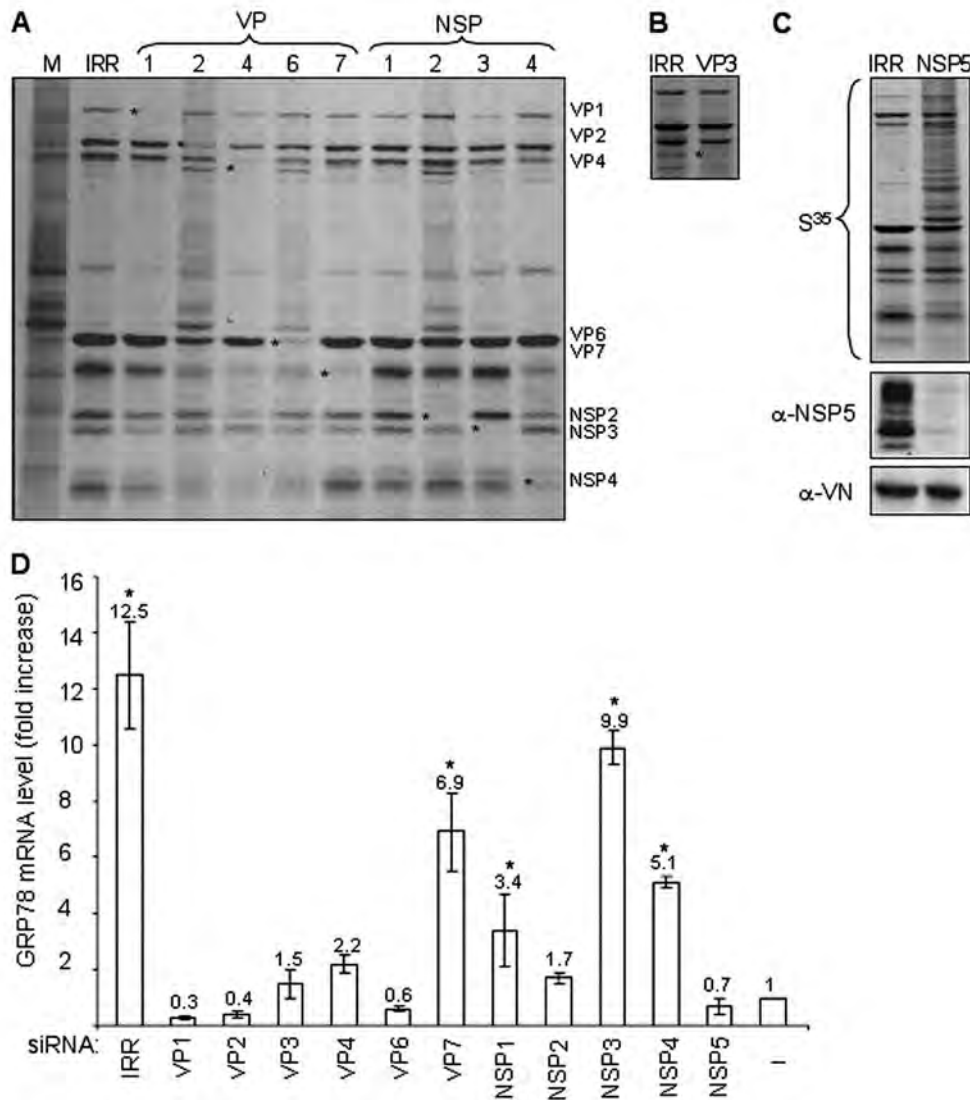


FIG. 6. Screening of the viral proteins responsible for triggering the UPR. Cells were transfected with the indicated siRNAs as described in Materials and Methods. (A) At 24 h posttransfection, the cells were mock infected (M) or infected with RRV at an MOI of 10, and 8.5 hpi cells were radiolabeled for 30 min with 25 μ Ci/ml of Easy Tag Express 35 S and then lysed. Mock-infected cells were not transfected. The labeled proteins were resolved by SDS-10% PAGE (A) or SDS-7% PAGE (B) and detected by autoradiography, or they were detected by immunoblot analysis with a rabbit antibody directed to NSP5 (C). Asterisks at the left of each lane in panel A show the knocked down protein. (D) In parallel wells, cells transfected with the indicated siRNAs were infected for 9 h, and total RNA was extracted and used to quantitate the level of GRP78 mRNA by qRT-PCR analysis. The mRNA level of GRP78 was normalized to the GAPDH mRNA level. The fold increase is relative to the values obtained for mock-infected cells (set as 1.0). Numbers above each bar indicate the fold increase with respect to mock-infected cells. The results represent the means \pm standard errors for three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between mock- and siRNA-treated cells determined by an ANOVA ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Increasing evidence supports the notion that UPR signaling pathways influence the pathogenesis associated with viral infections. Interestingly, several viruses have developed specific strategies to prevent, modify, or benefit from each of the pathways induced during the UPR (1, 3, 7, 23, 36, 43, 53, 55). To better understand the molecular pathogenesis induced by rotavirus, we examined the activation of each one of the three UPR arms following infection. For this, we used luciferase reporters driven by promoters of ER stress-responsive genes and qRT-PCR to determine the levels of the

stress-induced mRNAs. Taken together our results suggest that rotavirus infection induces a UPR that is suppressed by the viral nonstructural protein NSP3 at the translational level. This response seems to be triggered by a viral product synthesized during the replication cycle of the virus, more likely by one or more viral proteins, but not by the viral dsRNA, since cells transfected with psoralen-inactivated virions, or with naked viral dsRNA, did not start a UPR.

The IRE1-XBP1 pathway is involved in several functions related to ER stress, specifically, the activity of XBP1 coordinately augments the synthesis of the ER-resident chaperones,

degradation factors, and lipid components of the membrane. The control of this pathway at different levels has been described in cells infected with various viruses; for example, in enterovirus 71-infected cells, even though the level of XBP1 mRNA increases during infection, it is not spliced, suggesting an inhibition at the level of IRE1 activity (24). Similar to our findings, cell infection with hepatitis C virus (55), human cytomegalovirus (23), or severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus (3) induces a progressive increase in the amount of spliced XBP1 mRNA; however, the upregulation of XBP1 target genes is not detected, indicating that either the translation or the transcriptional activity of XBP1 is blocked. In cells carrying hepatitis C virus replicons it has been observed that XBP1 is targeted for proteasomal degradation, thus blocking the induction of the ERAD pathway (26). In contrast, in cells infected with West Nile virus (36) or Japanese encephalitis virus or dengue virus (68), the IRE1-XBP1 pathway is activated, remains functional, and is associated with the survival of stressed cells, since the knockdown of XBP1 correlates with an enhanced cytopathic effect (36, 54). On the other hand, the efficient replication of coxsackievirus B3 has been associated with the activity of XBP1, since silencing the expression of XBP1 inhibits the synthesis of the viral protein VP1 and enhances the virus-induced cell death (69).

In this work we found that rotavirus infection of MA104 cells activates the first step of the IRE1-XBP1 pathway, since XBP1 mRNA became spliced. However, the translation of the XBP1s mRNA was prevented as a result of the general translational inhibition mediated by rotavirus NSP3 and, as a consequence, its downstream products were not activated (Fig. 1). The knockdown of NSP3 resulted in translation of the XBP1s mRNA and induction of the transcription of EDEM and P58. We previously observed that silencing the expression of NSP3 in RRV-infected MA104 cells resulted in an increased yield of viral progeny, which was associated with a delayed cytopathic effect (37). This extended viability of rotavirus-infected cells could be due to activation of XBP1, which might increase the folding capacity of the ER, promoting cell survival.

Recent studies have shown that the production of XBP1 protein is required for the enhanced cell survival induced by HSP70 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) under ER stress conditions (14, 22). PI3K-mediated signaling has been reported to occur early after rotavirus infection, and it has been proposed as a viral protection mechanism from cell apoptosis (2, 16). It will be interesting to characterize the expression of HSP70 and the activation of PI3K signaling in rotavirus-infected cells in which the expression of NSP3 is silenced.

Our results also indicated that in RRV-infected cells the ATF6 pathway is activated upon infection, since the transcription of GRP78 and CHOP, two of its gene targets, was induced. However, these results were not obvious when the expression of the luciferase reporters was initially used to monitor UPR in infected cells; it was necessary to look for the levels of transcription of the ATF6 target genes to find that there was indeed an induction of the ATF6 arm. The lack of translation of the luciferase reporters was due to translational inhibition mediated by NSP3. Thus, it is important to characterize both RNA and protein expression when studying UPR induction in viral infections, especially in the case of those viruses known to decrease or inhibit host protein synthesis. A

similar observation was recently made by Bechill et al. (3) when characterizing the UPR induced by coronavirus, which also induces a shutoff of cell protein synthesis.

In general, the activation of the UPR also leads to activation of PERK, which phosphorylates eIF2 α , with the consequent attenuation of cell translation that in turn reduces the protein load in the ER. Under these restrictive conditions the translation of ATF4, CHOP, and GADD34 is stimulated. The mRNA of ATF4 is translated using a translation shunting mechanism which functions preferentially under conditions of limiting amounts of eIF2 α ; ATF4 then activates the transcription of the CHOP and GADD34 genes. In cells infected with different viruses, the phosphorylation of eIF2 α plays a pivotal role in the translational control of viral and cellular mRNAs (62). However, different viruses, including rotavirus, have evolved mechanisms to either dephosphorylate eIF2 α (7) or to translate their mRNAs efficiently in the presence of phosphorylated eIF2 α (38, 46, 60). We have previously found that in rotavirus-infected cells eIF2 α becomes phosphorylated early during infection and remains in this state throughout the replication cycle of the virus. In that same study we found that when NSP3 was silenced the phosphorylation of eIF2 α was not affected (38). We also showed that the kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 α is PKR, not PERK (47). In this work we found that the mUTR-ATF4-luc reporter protein was not synthesized in rotavirus-infected cells, even when NSP3 was knocked down, suggesting that the phosphorylation of eIF2 α is not the only requisite for ATF4 translation in MA104 cells, or that its translation is selectively prevented in RRV-infected cells.

In contrast with the previous findings, while the CHOP-luc reporter was not translated, its mRNA increased during infection, suggesting that the limited synthesis of CHOP-luc was due to the NSP3 inhibition of translation. Indeed, when the expression of NSP3 was silenced we found that the activity of CHOP-luc increased in rotavirus-infected cells. Since it has been observed that both ATF4 and ATF6 can activate CHOP transcription (9, 67), it is possible that in rotavirus-infected cells the upregulation of CHOP and hence GADD34 might be induced mainly by ATF6.

Despite the fact that we found an increased transcription of the GADD34 mRNA during infection, we were not able to detect an increased amount of GADD34 by Western blotting in rotavirus-infected cells (results not shown). Furthermore, we previously showed that treatment of RRV-infected MA104 cells with salubrinal, a selective inhibitor of the dephosphorylation of eIF2 α by the GADD34/PP1 phosphatase complex (4), did not change the phosphorylation state of eIF2 α , suggesting that GADD34 was not active under those conditions (47). Taken together, these results suggest that either the synthesis or the function of GADD34 is blocked in rotavirus-infected cells. The mechanism of this modulation is unclear, but it appears not to depend on the known role of NSP3 in translation.

Another negative regulator of the phosphorylation of eIF2 α is P58, which is an inhibitor of protein kinases PERK and PKR (29, 65). We believe that the low expression of P58 (Fig. 1C), together with the lack of GADD34 function observed during rotavirus infection, might contribute to a persistent PKR signaling and a maintained phosphorylation state of eIF2 α . In

coxsackievirus B3-infected cells, overexpression of P58 increased VP1 protein production and decreased cell death, suggesting that P58 serves to promote overall host cell health and thereby viral protein production (69).

It has been shown that the spike protein of SARS coronavirus (6), the NS2B-3 of dengue 2 virus (68), the pUL38 protein of human cytomegalovirus (64), and the hydrophobic non-structural proteins NS4A and NS4B of West Nile virus (1) are the viral components responsible for the induction of UPR during infection, since heterologous expression of the mentioned proteins was sufficient to induce ER stress in transfected cells. In an attempt to identify the viral protein responsible for ER stress induction in rotavirus-infected cells, we silenced the expression of each viral gene by RNAi and analyzed the level of GRP78 mRNA as an indicator of ER stress. We found that silencing the expression of the two viral glycoproteins NSP4 and VP7 (which were the natural UPR inducer candidates, since they accumulate in the ER) did not result in a severe reduction in the level of GRP78 mRNA; similarly, NSP3 knockdown had little or no effect on UPR induction. In contrast, silencing the rest of the viral proteins caused different degrees of reduction in the activation of GRP78 transcription, where VP1, VP2, VP6, and NSP5 knockdown had the most severe effects. We propose that in RRV-infected cells, the activation of the UPR is not triggered by a single viral protein, but rather it could be a multifactorial event in which either the budding of the DLPs into the ER, the formation of viroplasm, or the activation of genome replication could be responsible for triggering the UPR. It remains to be determined which viral process during the replication cycle of rotaviruses is the main inducer of ER stress.

Although the UPR is primarily a survival response, the continuous activation of this response also results in cell death. The surprising finding that rotavirus replicates most efficiently under stressful conditions that shut off host protein synthesis and cellular responses, such as the UPR, raises interesting questions about the mechanisms involved in viral translation and the relationship between cell death and viral growth. It is interesting that viruses causing chronic infections have developed strategies to modulate ER stress signaling, while for viruses that cause acute infections the activation of these pathways represents a mechanism to induce cell death. The work of our group and that of other groups suggest that the activation of the cellular UPR and its modulation is an important determinant for viral replication/pathogenesis. Therefore, it is relevant to characterize the cellular responses triggered during infection in order to better understand the pathogenesis of viruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rafaela Espinosa and Pedro Romero for their technical assistance with cell culture and rotavirus purification, to Eugenio López, and Paul Gaytán for oligonucleotide synthesis, and to K. Mori (Kyoto University, Japan), N. S. Wong (University of Hong Kong), (R. Prywes, Columbia University, NY), and D. Ron (University of Cambridge, United Kingdom) for kindly providing us with their reporter plasmids.

This work was supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute and grant 60025 from CONACYT. V.T.-A. is a recipient of a scholarship from CONACYT.

REFERENCES

- Ambrose, R. L., and J. M. Mackenzie. 2011. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. *J. Virol.* **85**:2723–2732.
- Bagchi, P., et al. 2010. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. *J. Virol.* **84**:6834–6845.
- Bechill, J., Z. Chen, J. W. Brewer, and S. C. Baker. 2008. Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression. *J. Virol.* **82**:4492–4501.
- Boyce, M., et al. 2005. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**:935–939.
- Brodsky, J. L., and W. R. Skach. 2011. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**:464–475.
- Chan, C. P., et al. 2006. Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* **80**:9279–9287.
- Cheng, G., Z. Feng, and B. He. 2005. Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2 α dephosphorylation by the γ 134.5 protein. *J. Virol.* **79**:1379–1388.
- Estes, M. K., and A. Z. Kapikia. 2007. Rotaviruses, p. 1917–1974. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Fawcett, T. W., J. L. Martindale, K. Z. Guyton, T. Hai, and N. J. Holbrook. 1999. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* **339**:135–141.
- 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.
- Groene, W. S., and R. D. Shaw. 1992. Psoralen preparation of antigenically intact noninfectious rotavirus particles. *J. Virol. Methods* **38**:93–102.
- 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.
- Gupta, S., et al. 2010. HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1 α -XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol.* **8**:e1000410.
- Gutierrez, M., et al. 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **84**:9161–9169.
- Halasz, P., G. Holloway, and B. S. Coulson. 2010. Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection. *J. Gen. Virol.* **91**:2007–2018.
- Harding, H. P., M. Calfon, F. Urano, I. Novoa, and D. Ron. 2002. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**:575–599.
- Harding, H. P., et al. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**:1099–1108.
- Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron. 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**:897–904.
- Harding, H. P., et al. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**:619–633.
- Hetz, C. A. 2007. ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage. *Antioxid. Redox Signal.* **9**:2345–2355.
- Ishigaki, S., et al. 2010. AATF mediates an antiapoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1. *Cell Death Differ.* **17**:774–786.
- Isler, J. A., A. H. Skalet, and J. C. Alwine. 2005. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J. Virol.* **79**:6890–6899.
- Jheng, J. R., K. S. Lau, W. F. Tang, M. S. Wu, and J. T. Horng. 2010. Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. *Cell. Microbiol.* **12**:796–813.
- Kaufman, R. J. 2004. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **29**:152–158.
- Kaufman, R. J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**:1211–1233.
- Lai, W. L., and N. S. Wong. 2005. ROS mediates 4HPR-induced posttranscriptional expression of the Gadd153 gene. *Free Radic. Biol. Med.* **38**:1585–1593.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, and L. H. Glimcher. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **23**:7448–7459.

29. Lee, T. G., N. Tang, S. Thompson, J. Miller, and M. G. Katze. 1994. The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **14**:2331–2342.
30. Lee, Y. Y., R. C. Cevallos, and E. Jan. 2009. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **284**:6661–6673.
31. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. *Methods* **25**:402–408.
32. Lu, P. D., H. P. Harding, and D. Ron. 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **167**:27–33.
33. Ma, Y., and L. M. Hendershot. 2002. The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress Chaperones* **7**:222–229.
34. Malhotra, J. D., and R. J. Kaufman. 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**:716–731.
35. Maruri-Avidal, L., S. Lopez, and C. F. Arias. 2008. Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J. Virol.* **82**:5368–5380.
36. Medigeshi, G. R., et al. 2007. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J. Virol.* **81**:10849–10860.
37. Montero, H., C. F. Arias, and S. Lopez. 2006. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* **80**:9031–9038.
38. Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, and S. Lopez. 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **82**:1496–1504.
39. Nakamura, T., et al. 2010. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* **140**:338–348.
40. Novoa, I., H. Zeng, H. P. Harding, and D. Ron. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* **153**:1011–1022.
41. Palam, L. R., T. D. Baird, and R. C. Wek. 2011. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J. Biol. Chem.* **286**:10939–10949.
42. 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.
43. Pavio, N., P. R. Romano, T. M. Graczyk, S. M. Feinstone, and D. R. Taylor. 2003. Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 α kinase PERK. *J. Virol.* **77**:3578–3585.
44. 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.
45. 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, Netherlands.
46. Robert, F., et al. 2006. 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**:4632–4644.
47. Rojas, M., C. F. Arias, and S. Lopez. 2010. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus infection. *J. Virol.* **84**:10457–10466.
48. Ron, D. 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* **110**:1383–1388.
49. Rutkowski, D. T., et al. 2006. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* **4**:e374.
50. Rutkowski, D. T., and R. J. Kaufman. 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* **14**:20–28.
51. Shang, J., and M. A. Lehrman. 2004. Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**:390–396.
52. Shen, X., K. Zhang, and R. J. Kaufman. 2004. The unfolded protein response: a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J. Chem. Neuroanat.* **28**:79–92.
53. Smith, J. A., et al. 2006. Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* **80**:2019–2033.
54. Su, H. L., C. L. Liao, and Y. L. Lin. 2002. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J. Virol.* **76**:4162–4171.
55. Tardif, K. D., K. Mori, R. J. Kaufman, and A. Siddiqui. 2004. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **279**:17158–17164.
56. Tardif, K. D., K. Mori, and A. Siddiqui. 2002. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J. Virol.* **76**:7453–7459.
57. Tirasophon, W., A. A. Welihinda, and R. J. Kaufman. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* **12**:1812–1824.
58. Uemura, A., M. Oku, K. Mori, and H. Yoshida. 2009. Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J. Cell Sci.* **122**:2877–2886.
59. Vattem, K. M., and R. C. Wek. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:11269–11274.
60. Ventoso, I., et al. 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 α phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* **20**:87–100.
61. Wang, Y., et al. 2000. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275**:27013–27020.
62. Wek, R. C., H. Y. Jiang, and T. G. Anthony. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:7–11.
63. Wu, J., and R. J. Kaufman. 2006. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ.* **13**:374–384.
64. Xuan, B., Z. Qian, E. Torigoi, and D. Yu. 2009. Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J. Virol.* **83**:3463–3474.
65. Yan, W., et al. 2002. Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:15920–15925.
66. Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**:33741–33749.
67. Yoshida, H., et al. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **20**:6755–6767.
68. Yu, C. Y., Y. W. Hsu, C. L. Liao, and Y. L. Lin. 2006. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J. Virol.* **80**:11868–11880.
69. Zhang, H. M., et al. 2010. Coxsackievirus B3 infection activates the unfolded protein response and induces apoptosis through downregulation of p58IPK and activation of CHOP and SREBP1. *J. Virol.* **84**:8446–8459.

Review

Stress Granules in the Viral Replication Cycle

Hilda Montero ^{1,*} and Vicenta Trujillo-Alonso ²

¹ Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, 91190, Xalapa, Veracruz, México

² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, 62210, Cuernavaca, Morelos, México

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hmontero@uv.mx;
Tel.: +52-22-88-41-89-00 (ext. 13323); Fax: +52-22-88-41-89-35.

Received: 13 September 2011; in revised form: 13 November 2011 / Accepted: 14 November 2011 / Published: 18 November 2011

Abstract: As intracellular parasites, viruses require a host cell in order to replicate. However, they face a series of cellular responses against infection. One of these responses is the activation of the double-stranded RNA (dsRNA)-activated protein kinase R (PKR). PKR phosphorylates the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α), which in turn results in global protein synthesis inhibition and formation of stress granules (SGs). Recent studies have shown that SGs can interfere with the replicative cycle of certain viruses. This review addresses how viruses have evolved different control strategies at the SG level to ensure an efficient replication cycle during the cellular stress response triggered by the viral infection.

Keywords: stress granules; stress; PKR; eIF2

1. Introduction

Viral genomes do not code for all of the components that viruses require in order to complete their replication cycle. Thus, viruses are dependent on diverse factors and conditions in the host cell. However, the process of replication is not easy, because the viral presence within the cell represents a threat that triggers a complex and integrated antiviral response. Interestingly, some viruses have

developed strategies that enable them to counteract, tolerate, or even take advantage of this antiviral response, thereby allowing efficient replication.

2. A Brief Review of PKR and eIF2

One of the best known mechanisms employed by the cell to restrict viral infection is through double-stranded RNA (dsRNA)-activated protein kinase R (PKR), which is activated by binding to dsRNA, which is generally produced as an intermediary of replication cycle of many viruses [1–3]. PKR is part of the interferon (IFN) response that induces an antiviral state in the infected cell and neighbor cells [2,4]. In the infected cell, PKR phosphorylates the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α), a modification that blocks the eIF2-GTP-Met-tRNAi^{Met} ternary complex (TC) formation that results in the inhibition of cellular and viral protein synthesis [5]. Thus, by inhibiting the viral protein synthesis, the function of PKR via eIF2 α could prevent the formation of new viruses.

Phosphorylation of eIF2 α is carried out not only by PKR but also by three other members of the same family of eIF2 α kinases that sense specific stress conditions in which the cell is under threat: the general control non-derepressible 2 kinase (GCN2), which responds to the absence of amino acids and other nutrients; the heme-regulated kinase (HRI), which is activated under conditions of intracellular iron deficiency or heat shock; and the PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), which is activated by an accumulation of unfolded or misfolded proteins. In all of these cases, activation of these kinases induces the phosphorylation of eIF2 α , thereby blocking the cellular translation process [6–8].

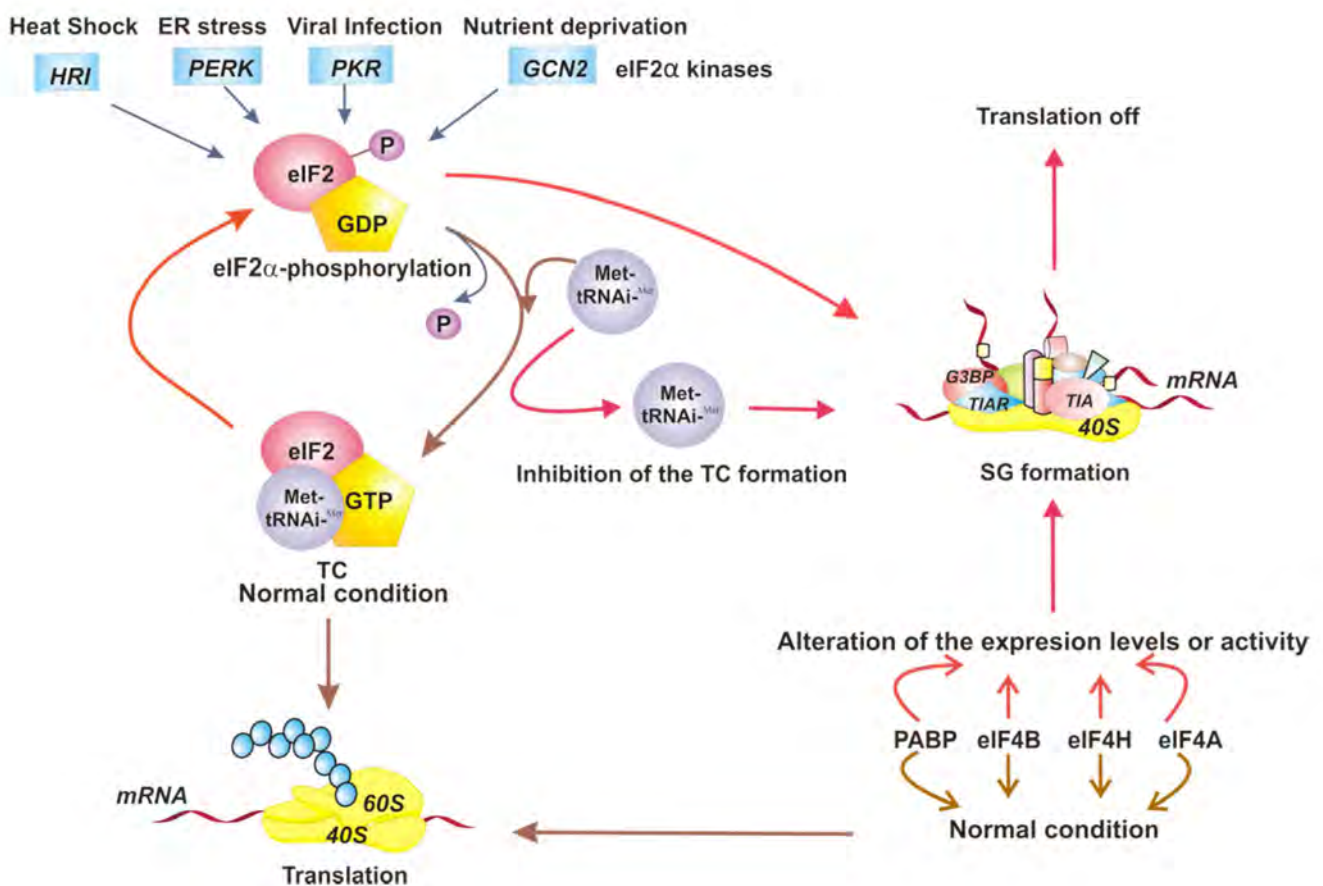
Given the role of PKR, many viruses, such as vaccinia, influenza, and poliovirus (PV), employ mechanisms to avoid its activation or to block its function [9–11]. However, the presence of a virus within a cell generates many cellular changes that trigger not only the activation of PKR but also the activation of GCN2 or PERK or both [12,13]. Consequently, the viral strategies could operate at the level of eIF2 and not necessarily operate over each one of its kinases. Accordingly, some viruses (herpes simplex virus type 1 [14]) revert the phosphorylation of eIF2 α to maintain its function, whereas other viruses (Sindbis virus [15] and cricket virus [16,17]) employ translational mechanisms independent of eIF2. In addition, eIF2 is a cell death regulator that makes it an important control target for those viruses that inhibit or stimulate cell survival [18,19]. One of the disadvantages of viral control at the level of eIF2, but not control over each one of the eIF2 α kinases, could be the induction of several cellular responses like IFN by PKR or Unfolded Protein Response by PERK. Therefore, it is not surprising that the same virus regulates the cellular antiviral response at more than one level with different goals, and this could depend on the needs that arise during the viral cycle and could be related to whether a chronic or acute infection is established.

3. Stress Granules

PKR and eIF2 are not the only factors that limit the production of new viral particles. The formation of stress granules (SGs) was recently described as being part of the cellular response to stress generated by viral infection [20]. The SGs are aggregates that contain preinitiation complexes, a feature that suggests that this is where translation is arrested under different stress conditions [21,22]. Interestingly, the SGs have also been shown to be important regulators of cell death [23].

Initially, it was proposed that SGs are assembled in response to the phosphorylation of eIF2 α [24]. However, it has been shown that they are also formed as a consequence of the modification of the expression levels or activity of translational factors, specifically those involved in the initiation phase, such as eIF4A [25], eIF4H, eIF4B, and poly A-binding protein (PABP), or by preventing the formation of the TC by inhibiting the Met-tRNAi^{Met} association [22]. The formation of SGs, therefore, occurs in response to various alterations related to the initiation step of cellular protein synthesis (Figure 1).

Figure 1. Model of the different stimuli that direct the assembly of stress granules (SGs). The four eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) kinases respond to different conditions of intracellular stress, causing phosphorylation of eIF2 α and leading to the assembly of SGs. The inhibition of formation of eIF2-GTP-Met-tRNAi^{Met} ternary complex (TC) directs the SG formation also. On the other hand, the alteration of expression level or function of translational factors such as eIF4A, eIF4B, eIF4H, and poly A-binding protein (PABP) induces SG assembly. Under normal conditions, the translation is on. The SG assembly turns translation off.



To date, the mechanism of SG formation is not entirely understood, and more than 100 genes involved in SG assembly and disassembly have been described [26], suggesting that SG formation is a very complex process. In relation to SG formation, some studies have proposed certain proteins as being responsible for the assembly of these aggregates. Within these effector proteins, which also form part of the SGs, are T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1), TIA-1-related protein (TIAR), and Ras-GAP SH3-binding protein (G3BP) [24,27].

It is important to mention that the composition of the SGs varies according to the type of stress [24,28]. Some immunofluorescence microscopy studies suggest that, in addition to being formed by effector proteins, SGs are generally formed by mRNAs; the 40S (but not the 60S) ribosomal subunits; initiation factors such as eIF3, eIF4G, eIF4E, phosphorylated eIF2 α [29], and eIF2 [28]; and RNA-binding proteins such as PABP, FMRP (fragile X mental retardation protein), HuR (AU-rich element-binding protein), TTP (tristetraprolin) [21], and caprin-1 [30].

Given that SGs are constituted by preinitiation complexes, it could be expected that the majority of mRNAs are recruited into the SGs. However, mechanisms that determine which mRNAs will be included exist. In two different studies, it was observed that heat shock mRNAs are not found in SGs but were predominantly associated with polysomes [31,32]. Even though the reasons of inclusion or exclusion of mRNAs into SGs have not been established, recent studies show that mRNAs bound to endoplasmic reticulum are not aggregated to the SGs and that the 5'-UTR (5'-untranslated region) plays an important role in their exclusion [33].

The SGs are not aggregated permanently. They disassemble when the cell recovers from a sublethal stress and consequently protein synthesis is restored [21,24,29,34]. The mechanism of disassembly of SGs is also poorly understood, but proteins such as Staufen-1, which binds to dsRNA [35] and microtubules [36], have been described as being important to the disassembly of these aggregates.

4. Stress Granules and Viruses

Given their roles as part of the inhibition of cellular protein synthesis and as regulators of cell death, the SGs turn out to be another viral control point downstream of PKR and eIF2. Because each virus undergoes a particular replicative cycle, the impact of SG formation is different for each virus; thus, the viruses could modulate the assembly, composition, or disassembly of SGs according to the replicative cycle. Recent studies have provided valuable information about the relationships between SGs and viral infection. In general, two possibilities exist: the replication cycle of the virus is completed despite the presence of SGs, or the formation of SGs is blocked by viral mechanisms.

Translational regulation during infection with PV is one of the most studied mechanisms, and this virus has been shown to cause a rapid inhibition of cellular protein synthesis through the cleavage of factors eIF4GI, eIF4GII, and PABP [37,38]. In PV-infected cells, the formation of SGs occurs early in the infection and is independent of eIF2 α phosphorylation, which happens in a late phase of the infection. The SGs in PV-infected cells are not conventional, because they exclude G3BP, PABP, and eIF4G, and the SGs are assembled next to cell structures containing viral RNA [39,40]. The role of SGs during PV infection is not yet clear; however, there are data showing that SG composition could be important because the incorporation of G3BP into the SGs has a negative impact on PV replication [40]. Another interesting finding is that, in PV-infected cells, the cellular transcription is a modulator of SG assembly since treatment with actinomycin D, an inhibitor of cellular transcription, prevents SG formation [39]. This suggests that the cellular transcription is an intracellular event that may be important to SG assembly in the context of infection. In summary, PV is a virus that modulates the composition of SGs, possibly by interfering with its replicative cycle.

In cells infected by the mammalian orthoreovirus (MRV), SG formation is an early event observed in response to virus entry and does not correlate temporally with eIF2 α phosphorylation, suggesting

that SGs are formed by a mechanism that is triggered from the first contacts between the virus and its host cell. Interestingly, in the early phase of infection, the SGs include viral core particles but the significance of this remains unclear. SG disassembly is observed as the replication cycle progresses. SG disassembly correlates with an increase of viral protein synthesis [41], indicating that any viral protein may be involved in this process. MRV is, thus, an example of a virus that could regulate the assembly-disassembly of SGs as infection progresses.

The mouse hepatitis coronavirus (MHV) has a replication strategy that makes it tolerant to the presence of SGs as these are assembled during infection in response to eIF2 α phosphorylation. Despite this, studies in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that express a mutant unphosphorylatable eIF2 α show that the formation of new viral particles is increased, suggesting that the shutoff of protein synthesis and the formation of SGs limit their replication cycle to some extent [42]. Similarly, during infection with respiratory syncytial virus (RSV), eIF2 α phosphorylation is observed [43], and the virus also replicates in the presence of SGs. In contrast to MHV infection, during RSV infection, SG assembly has a beneficial effect because, when SG formation is prevented through knockdown of G3BP, viral replication decreases [44].

A strategy very different from SG regulation is presented in cells infected with the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), which can switch SG formation on or off, at its convenience, through the Tax viral protein. Interestingly, Tax shuttles from the nucleus to the cytoplasm in response to several types of stress. When found in the cytoplasm, Tax binds to histone deacetylase 6 (HDAC6) and impedes the formation of SGs, ensuring the synthesis of proteins that may be important for the HTLV-1 replicative cycle. This finding shows that HDAC6 is critical to SG formation. In contrast, when Tax is found in the nucleus, SGs are formed spontaneously [45], and this possibly confers upon cells a resistance to stress by increasing survival [23] and consequently favors the replicative cycle. This type of strategy may allow the establishment of a chronic infection by stimulating cellular events that induce the immortalization and proliferation of infected cells. The study of the pathogenesis of this virus reveals the important role played by HDAC6 as an effector protein of SGs.

Of viruses described here, some can tolerate the antiviral response mediated by SG formation. However, SGs appear to limit the maximum efficiency of the production of viral progeny in the majority of the cases. On the other hand, it should be noted that SG formation could not be necessarily the final event of PKR-mediated phosphorylation eIF2 α or of alterations of translational initiation factor. Notably, in the context of viral infection, the SGs can be formed by other stimuli or signaling pathways, such as viral entry (MRV), disturbances of cellular transcription (PV), and the regulation of effector proteins of SGs (HTLV-1) (Figure 2). All of these findings suggest that SG formation could be the results of a great diversity of interconnected intracellular events leading to the same level of regulation.

Figure 2. Model of three intracellular events that regulate the assembly of stress granules (SGs) during viral infections. **(A)** Poliovirus (PV) infection stimulates the SG formation early in infection. Later in infection, these SGs have a different composition because they do not contain all of the proteins observed in conventional SGs. Also, in PV-infected cells, cellular transcription is important for the assembly of SGs. **(B)** Orthoreovirus mammalian infection (MRV) induces the formation of SGs in response to virus entry. MRV cores in SGs can be observed at early times of infection. The SGs are dissolved at later times of infection. **(C)** Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection. Under intracellular stress, the viral protein Tax shuttles to the cytoplasm from the nucleus, binds to histone deacetylase 6 (HDAC6), and thereby blocks the formation of SGs. The dotted line indicates that, when Tax is in the nucleus of the cell, SGs are formed spontaneously.

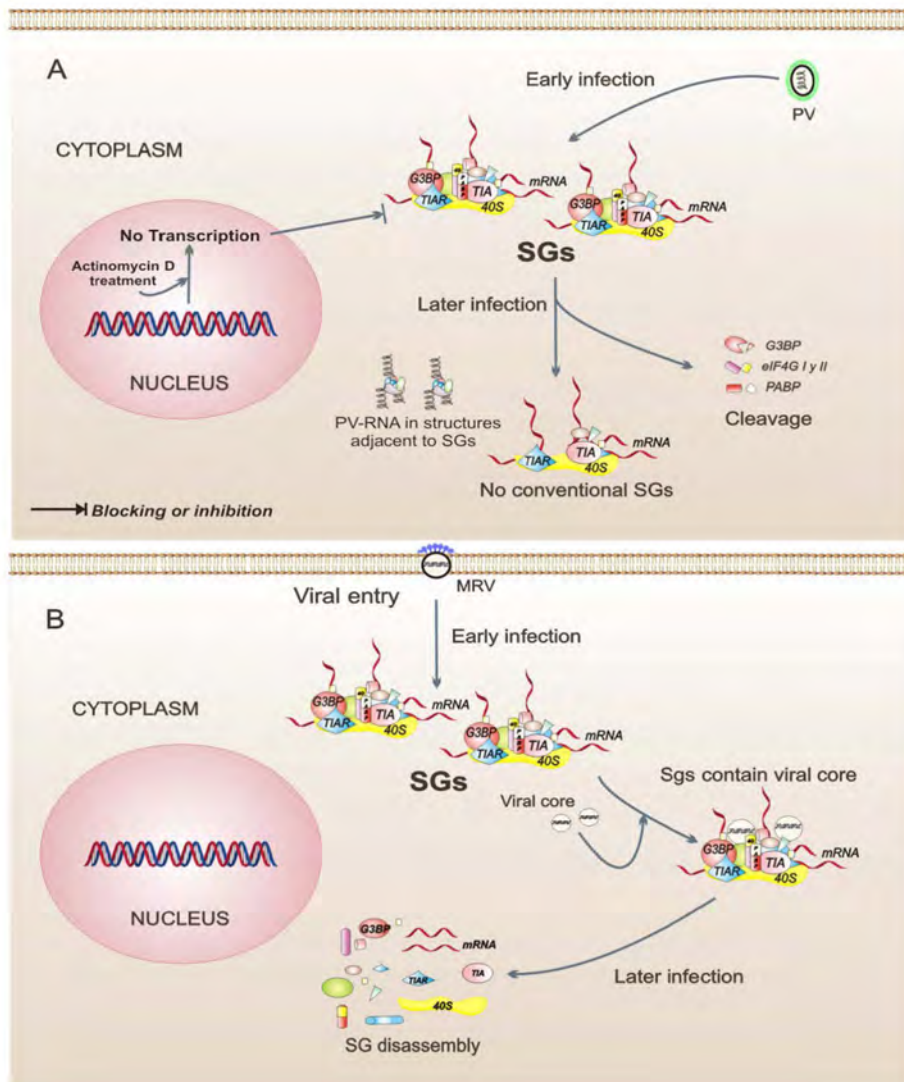
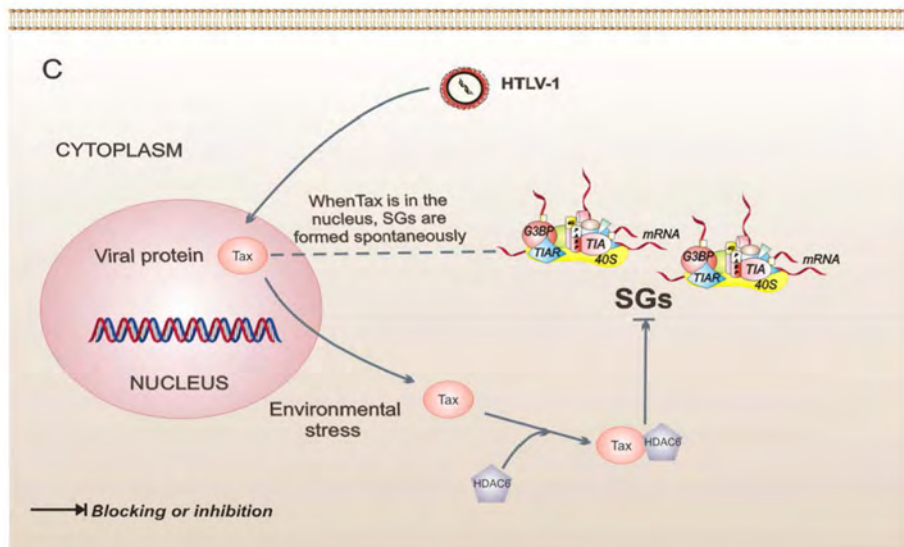


Figure 2. Cont.



5. Viruses that Interfere with the Assembly of Stress Granules

In the case of cells infected with West Nile virus (WNV) or dengue virus (DV), effector proteins such as TIA-1 and TIAR have a function different from SG formation. It has been shown that both cellular proteins are hijacked by the viral replication complexes and this event can confer to the infected cell resistance to SG formation induced by stressors such as sodium arsenite, a classic inducer of oxidative stress [46]. The presence of TIAR in the replication complexes benefits the viral life cycle of these viruses because, in MEFs that lack TIAR, viral progeny is decreased [47]. Thus, WNV and DV are good examples of viruses that take advantage of cellular antiviral response by using effector proteins of this cellular event.

It was recently shown that PKR phosphorylates eIF2 α [48] from the early stages of infection in rotavirus-infected cells. Despite the eIF2 α phosphorylation, the formation of SGs is not observed. Rotavirus infection, like WNV and DV infection, confers cellular resistance to the assembly of SGs by treatment with sodium arsenite [49]. Rotavirus has developed a replication mechanism that allows it to overcome eIF2 α phosphorylation-mediated translational inhibition and avoids the formation of SGs.

The previous examples of viral infections, in which SG assembly is not observed, show that some viruses have evolved different mechanisms to block the antiviral response at the SG level. Additional experiments are required the elucidation of inhibition mechanisms and the role of SGs in the replicative cycle.

6. Conclusions

Despite the knowledge generated in the field of SGs, unresolved issues remain. Because SGs are part of the antiviral response, the viruses regulate this event in order to replicate. It is clear that each virus is related differently to SG formation since the replicative cycle of each virus has different needs. Further study of the molecular mechanisms of SG formation and disassembly, as well as their role and possible regulation, will not only yield information regarding these aggregates but also enable the design of drugs and strategies to control virus replication.

Acknowledgments

We would like to thank Rebeca Garcia and José Eriban Barradas for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by grants 106459 and 109397 from the National Council for Science and Technology-Mexico.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Clemens, M.J. PKR a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 945–949.
2. Pindel, A.; Sadler, A. The role of protein kinase R in the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res.* **2011**, *31*, 59–70.
3. Sadler, A.J.; Williams, B.R. Structure and function of the protein kinase R. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2007**, *316*, 253–292.
4. Raven, J.F.; Koromilas, A.E. PERK and PKR: Old kinases learn new tricks. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1146–1150.
5. Kimball, S.R. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 25–29.
6. Proud, C.G. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2005**, *16*, 3–12.
7. Wek, R.C.; Jiang, H.Y.; Anthony, T.G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 7–11.
8. de Haro, C.; Mendez, R.; Santoyo, J. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *Faseb. J.* **1996**, *10*, 1378–1387.
9. 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.* **2006**, *119*, 100–110.
10. Schneider, R.J.; Mohr, I. Translation initiation and viral tricks. *Trends. Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 130–136.
11. Mohr, I. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res.* **2006**, *119*, 89–99.
12. Berlanga, J.J.; Ventoso, I.; Harding, H.P.; Deng, J.; Ron, D.; Sonenberg, N.; Carrasco, L.; de Haro, C. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1730–1740.
13. 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.* **2005**, *79*, 1379–1388.
14. Cheng, G.; Yang, K.; He, B. Dephosphorylation of eIF-2alpha mediated by the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus type 1 is required for viral response to interferon but is not sufficient for efficient viral replication. *J. Virol.* **2003**, *77*, 10154–10161.

15. Ventoso, I.; Sanz, M.A.; Molina, S.; Berlanga, J.J.; Carrasco, L.; Esteban, M. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: A strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 87–100.
16. Bushell, M.; Sarnow, P. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J. Cell Biol.* **2002**, *158*, 395–399.
17. Jan, E.; Sarnow, P. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J. Mol. Biol.* **2002**, *324*, 889–902.
18. Srivastava, S.P.; Kumar, K.U.; Kaufman, R.J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2416–2423.
19. Muaddi, H.; Majumder, M.; Peidis, P.; Papadakis, A.I.; Holcik, M.; Scheuner, D.; Kaufman, R.J.; Hatzoglou, M.; Koromilas, A.E. Phosphorylation of eIF2alpha at serine 51 is an important determinant of cell survival and adaptation to glucose deficiency. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 3220–3231.
20. Beckham, C.J.; Parker, R. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* **2008**, *3*, 206–212.
21. Kedersha, N.; Anderson, P. Stress granules: Sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 963–969.
22. Mokas, S.; Mills, J.R.; Garreau, C.; Fournier, M.J.; Robert, F.; Arya, P.; Kaufman, R.J.; Pelletier, J.; Mazroui, R. Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 2673–2683.
23. Arimoto, K.; Fukuda, H.; Imajoh-Ohmi, S.; Saito, H.; Takekawa, M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1324–1332.
24. 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.* **1999**, *147*, 1431–1442.
25. Mazroui, R.; Sukarieh, R.; Bordeleau, M.E.; Kaufman, R.J.; Northcote, P.; Tanaka, J.; Gallouzi, I.; Pelletier, J. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 4212–4219.
26. Ohn, T.; Kedersha, N.; Hickman, T.; Tisdale, S.; Anderson, P. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1224–1231.
27. Tourriere, H.; Chebli, K.; Zekri, L.; Courselaud, B.; Blanchard, J.M.; Bertrand, E.; Tazi, J. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 823–831.
28. Dang, Y.; Kedersha, N.; Low, W.K.; Romo, D.; Gorospe, M.; Kaufman, R.; Anderson, P.; Liu, J.O. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32870–32878.
29. Kedersha, N.; Chen, S.; Gilks, N.; Li, W.; Miller, I.J.; Stahl, J.; Anderson, P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 195–210.

30. Solomon, S.; Xu, Y.; Wang, B.; David, M.D.; Schubert, P.; Kennedy, D.; Schrader, J.W. Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 2324–2342.
31. Nover, L.; Scharf, K.D.; Neumann, D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 1298–1308.
32. Collier, N.C.; Heuser, J.; Levy, M.A.; Schlesinger, M.J. Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 1131–1139.
33. Unsworth, H.; Raguz, S.; Edwards, H.J.; Higgins, C.F.; Yague, E. mRNA escape from stress granule sequestration is dictated by localization to the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3370–3380.
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.* **2003**, *284*, C273–C284.
35. Thomas, M.G.; Martinez Tosar, L.J.; Desbats, M.A.; Leishman, C.C.; Boccaccio, G.L. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 563–573.
36. Nadezhdina, E.S.; Lomakin, A.J.; Shpilman, A.A.; Chudinova, E.M.; Ivanov, P.A. Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1803*, 361–371.
37. 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.* **1998**, *95*, 11089–11094.
38. Kuyumcu-Martinez, N.M.; Van Eden, M.E.; Younan, P.; Lloyd, R.E. Cleavage of poly(a)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: A novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 1779–1790.
39. Piotrowska, J.; Hansen, S.J.; Park, N.; Jamka, K.; Sarnow, P.; Gustin, K.E. Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. *J. Virol.* **2010**, *84*, 3654–3665.
40. White, J.P.; Cardenas, A.M.; Marissen, W.E.; Lloyd, R.E. Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe* **2007**, *2*, 295–305.
41. Qin, Q.; Hastings, C.; Miller, C.L. Mammalian orthoreovirus particles induce and are recruited into stress granules at early times postinfection. *J. Virol.* **2009**, *83*, 11090–11101.
42. Raaben, M.; Groot Koerkamp, M.J.; Rottier, P.J.; de Haan, C.A. Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 2218–2229.
43. Lindquist, M.E.; Mainou, B.A.; Dermody, T.S.; Crowe, J.E., Jr. Activation of protein kinase R is required for induction of stress granules by respiratory syncytial virus but dispensable for viral replication. *Virology* **2011**, *413*, 103–110.
44. Lindquist, M.E.; Lifland, A.W.; Utley, T.J.; Santangelo, P.J.; Crowe, J.E., Jr. Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12274–12284.

45. Legros, S.; Boxus, M.; Gatot, J.S.; Van Lint, C.; Kruys, V.; Kettmann, R.; Twizere, J.C.; Dequiedt, F. The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene* **2011**, *30*, 4050–4062.
46. Emara, M.M.; Brinton, M.A. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9041–9046.
47. Li, W.; Li, Y.; Kedersha, N.; Anderson, P.; Emara, M.; Swiderek, K.M.; Moreno, G.T.; Brinton, M.A. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.* **2002**, *76*, 11989–12000.
48. Rojas, M.; Arias, C.F.; Lopez, S. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 10457–10466.
49. Montero, H.; Rojas, M.; Arias, C.F.; Lopez, S. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **2008**, *82*, 1496–1504.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).