



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN
EN CÉLULAS
INFECTADAS POR ROTAVIRUS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ROSA MARÍA RUBIO ROBLES

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

**DRA. IRMA GONZÁLEZ HERRERA, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA
DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN, CINVESTAV**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



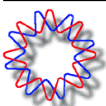
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

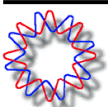
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por SEP-CONACYT #153639 y con un donativo de DGAPA # IN211411-3.



*Dedicada a mis padres por su amor, apoyo
incondicional y por ser lo mejor de mi vida*



AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el cariño, apoyo y motivación.

A Janssel por ayudarme a crecer como persona, por impulsarme, por su apoyo en todo momento y sobre todo su amor.

A la Dra. Susana López por ser mi guía, por todos los conocimientos compartidos, por su gran contribución en mi formación como investigador y especialmente por su cariño.

Al Dr. Carlos Arias por ayudar a mi preparación con sus sugerencias y comentarios y por ser además un amigo.

A Rafita y Don Pedrito por ser los otros dos pilares del laboratorio contribuyendo enormemente a mi formación y por todo el cariño que me dan.

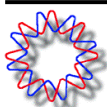
Al grupo Arias/López por ser más que unos compañeros, una segunda familia.

A mi comité tutorial, Dra. Irma González y Juan Ernesto Ludert por las sugerencias y comentarios durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales Dr. Ramón González, Dra. Leonor Pérez, Dra. Ana Lorena Gutiérrez, Dr. José Luis Reyes y Dr. Takuya Nishigaki por la revisión de esta tesis.

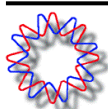
A todos mis amigos por darle luz a mi vida.

A Ernesto ... por todas sus enseñanzas, su apoyo y ejemplo.

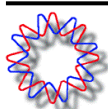


ABREVIATURAS

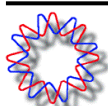
3-PIs	3-fosfoinosítidos
4E-BPs	Proteínas de unión a eIF4E
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca²⁺	Ion calcio
cDNA	DNA complementario
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DLP	Partícula de doble capa
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
eIF	Factor de inicio de la traducción eucariótico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FCV	Calicivirus felino
g	Aceleración de la gravedad
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
Gluc	Luciferasa de <i>Gaussia</i>
Grp78	Proteína regulada por glucosa 78
Grp94	Proteína regulada por glucosa 94
GTP	Adenosín trifosfato
h	horas
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxiethyl)-1-Pireracil-Etanosulfónico
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
hpi	horas post infección
hpt	horas post transfección
Hsc70	Proteína de choque térmico constitutiva
HSV	Virus de herpes simple
IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma
kDa	KiloDalton
KSHV	Herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi
Luc	Luciferasa
M	Molar
MEM	Medio esencial mínimo
Met	Metionina
Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MNV	Norovirus murino
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Blanco de Rapamicina de mamífero
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro



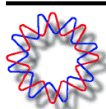
nM	Nanomolar
NSP	Proteína no estructural
ORF	Marco de lectura abierto
PABP	Proteína de unión a PoliA
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	Proteína cinasa de RE
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PIC	Complejo de pre-iniciación
PKR	Proteína cinasa dependiente de dsRNA
pmol	Picomol
PoliA	Poliadenina
qRT-PCR	PCR en tiempo real
RE	Retículo endoplásmico
RI	Intermediario de replicación
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNP	Ribonucleoproteína
RoXaN	Del inglés “rotavirus X protein associated with NSP3”
rpm	Revoluciones por minuto
RRM	Motivo de unión a RNA
rRNA	RNA ribosomal
RRV	Cepa de rotavirus de mono <i>rhesus</i>
RT	Transcripción reversa
RV	Rotavirus
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	RNA interferente pequeño
SSC	Citrato de sodio salino
ssRNA	RNA de cadena sencilla
TC	Complejo ternario
TCA	Ácido tricloroacético
TLP	Partícula de triple capa
Tris	Hidroximetil aminometano
tRNA	RNA de transferencia
tRNA_i	tRNA iniciador
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
VP	Proteína viral estructural
VSV	Virus de estomatitis vesicular
μCi	Microcurie
μg	Microgramo
μl	Microlitro



	PÁGINA
Agradecimientos	III
Abreviaturas	IV
Índice	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Rotavirus.....	3
Generalidades.....	3
Clasificación.....	4
Características de la Partícula Viral.....	5
Organización del Genoma Viral.....	5
Ciclo Replicativo.....	7
Síntesis de proteínas.....	10
Virus y síntesis de proteínas.....	16
Antecedentes del control traduccional en la infección con rotavirus.....	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Células y virus.....	20
Anticuerpos.....	20
Infección de células y titulación de la progenie viral.....	20
siRNAs.....	21
Plásmidos.....	21
Transcripción <i>in vitro</i> de mRNAs.....	22
Transfección de siRNAs.....	23
Transfección de Plásmidos.....	24
Transfección de RNA.....	24
Western blot.....	24
Marcaje metabólico.....	25
Cuantificación de incorporación de marca por precipitación con TCA.....	25
Inmunofluorescencia.....	25
RT-PCR en tiempo real.....	26
Cuantificación del mRNA viral.....	27
Cuantificación absoluta.....	28
Cuantificación relativa.....	28
Ensayos de Luciferasa.....	29
Preparación de extractos citoplásmicos y nucleares.....	29
Cuantificación de mRNAs poliadenilados.....	29
Preparación de RNAs con o sin PoliA para hibridación.....	30
Northern blot.....	30



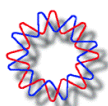
Cromatografía con cap.....	30
RESULTADOS.....	32
Papel de los componentes del complejo eIF4F en la traducción de los mRNAs celulares.....	32
Papel de los componentes del complejo eIF4F en el ciclo replicativo de rotavirus.....	32
La relocalización de PABP no depende de su interacción con eIF4G.....	37
La proteína viral VP2 se encuentra en complejos proteicos asociados al cap.....	37
Efecto de las regiones no traducidas de los RNAs mensajeros virales en la eficiencia de traducción en células infectadas.....	41
Localización de los mRNAs poliadenilados en células infectadas.....	44
La expresión de un gen reportero en células infectadas depende de su localización subcelular..	46
La infección por rotavirus cambia la distribución subcelular de algunos mRNAs celulares.....	47
Durante la infección se hiperadenilan los mRNAs celulares que se acumulan en el núcleo.....	50
Cuantificación de mRNAs poliadenilados en células infectadas.....	51
Cuantificación de los mRNAs virales durante la infección.....	52
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS.....	62
REFERENCIAS.....	63
ANEXO.....	71



RESUMEN

Los rotavirus representan la causa principal de gastroenteritis en niños menores de 2 años. Durante la infección con estos virus hay una severa reducción en la síntesis de proteína celular, este fenotipo es causado en parte por la interacción de la proteína viral no estructural (NSP) 3, con el factor de inicio de la traducción (eIF) 4G.

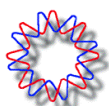
Durante el inicio de la traducción el cap de los RNAs mensajeros (mRNAs) es reconocido por el complejo eIF4F. Este complejo se compone por la helicasa eIF4A, la proteína de unión al cap eIF4E y el factor eIF4G. Este último existe en la célula como dos formas funcionalmente homólogas, eIF4GI y eIF4GII. eIF4A y eIF4E se unen a eIF4G, el cual por medio de interacciones con otras proteínas recluta a la subunidad pequeña ribosomal 40S en el extremo 5' de los RNAs mensajeros. Otra interacción muy importante es la que se da entre eIF4G y la proteína de unión a poliA (PABP), ya que debido a esto se ponen en proximidad los extremos 5' y 3' de los mRNAs, lo que provoca la circularización de los mismos y a su vez, estimula su traducción. En este trabajo se estudió el papel de los factores de inicio de la traducción que forman el complejo eIF4F (eIF4E, eIF4GI y eIF4GII, y eIF4AI) y de PABP, en la infección del virus. El papel principal que se ha descrito para estas proteínas es en la traducción, sin embargo, encontramos que a excepción de eIF4GII, su presencia no es requerida para la síntesis de las proteínas virales, pero sí lo es para la producción de partículas infecciosas, hecho que se relaciona con una disminución en la cantidad de RNA mensajero y de doble cadena del virus. En células infectadas PABP se relocaliza en el núcleo, hecho inducido por la proteína viral NSP3. Observamos que durante la infección, los mRNAs con cola poliA se hiperadenilan y también se acumulan en el núcleo. Analizamos si las regiones no traducidas (UTRs) 5' o 3' determinaban la eficiencia de traducción de los mRNAs en células infectadas, mediante el uso del gen de luciferasa como reportero. Encontramos que sin importar los UTRs utilizados (de origen celular o viral), los reporteros se tradujeron con mayor eficiencia en células infectadas comparado con células sin infectar. Además, observamos que si un mRNA reportero poliadenilado se introduce directamente en el citoplasma de células infectadas, su traducción es muy eficiente; en cambio, cuando el mismo reportero se introduce a la célula a través de un plásmido, el cual tiene que ser transcrito y exportado del núcleo, su expresión es muy pobre. En conjunto, nuestros resultados sugieren que a través de la regulación del exporte de mRNAs del núcleo a citoplasma, rotavirus controla la síntesis de proteínas celulares y a su vez la respuesta antiviral de la célula.



ABSTRACT

Rotavirus is the most important agent of severe gastroenteritis in young children. Early in infection, these viruses take over the host translation machinery, causing a severe shutoff of cell protein synthesis. It has been proposed that this phenotype is caused by the viral nonstructural protein NSP3, at least in part, through its interaction with the initiation factor eIF4G.

The initiation step of translation begins upon recognition of the 5' cap structure by eIF4F, a multisubunit complex comprising the cap binding protein eIF4E, the ATP-dependent RNA helicase eIF4A, and the large molecular scaffold eIF4G. Two isoforms of eIF4G, eIF4GI and eIF4GII, have been described in eukaryotic cells. While eIF4E binds the cap, eIF4G associates with ribosome-bound eIF3 to tether the 43S complex to the mRNA 5' end. eIF4G also engages the polyA-binding protein (PABP). PABP is actually bound to the polyA tail at the 3' end of the messenger RNAs (mRNAs), and its interaction with eIF4G leads to mRNA circularization. In this work we studied the role of the proteins of the eIF4F complex and PABP on the replicative cycle of rotavirus. None of these proteins seemed to be essential for the translation of viral mRNAs, with the exception of eIF4GII, but apparently they are necessary during the replication of the virus since, in their absence, the amount of viral genomic and mRNA was reduced with a consequent reduction in viral yield. In rotavirus-infected cells there is a relocalization of PABP to the nucleus that is induced by NSP3. We found that mRNAs with polyA tail also accumulate and become hyperadenylated in the nuclei of infected cells. We analyzed if the 5' or 3' UTR determined the efficiency of translation of mRNAs in infected cells, using the luciferase gene as reporter. We found that irrespectively of the 5' or 3' UTR used, the various constructs were more efficiently translated in infected cells as compared to mock-infected cells. Furthermore, we found that the translation of a polyadenylated reporter mRNA in infected cells depends on its site of delivery (nuclear if transcribed from a reporter plasmid or cytoplasmic if introduced as *in vitro* synthesized mRNA). Altogether, these results suggest that nuclear retention of polyA-containing mRNAs is one of the main strategies of rotavirus to control the expression of cellular proteins, and therefore the host antiviral and stress responses.



INTRODUCCIÓN

Rotavirus

Generalidades

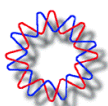
Los Rotavirus son reconocidos como la causa principal de gastroenteritis en niños menores de dos años y están involucrados anualmente en la muerte de 453,000 niños menores de cinco años en todo el mundo (1).

Estos virus fueron inicialmente descritos en humanos en 1973 por Bishop y Holmes en Australia (2), quienes encontraron la presencia de partículas virales al observar al microscopio electrónico biopsias de intestino delgado de niños que tenían diarrea severa de origen no bacteriano. En base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico era la de una rueda de carreta antigua, estos virus fueron nombrados rotavirus (del latín rota = rueda) (3).

La infección por rotavirus es muy común, se ha observado que a la edad de 5 años, el 95 % de los niños ya han sido infectados. El pico de incidencia de la enfermedad es en los niños de entre 6 y 24 meses de edad, siendo ésta, la población con más alto riesgo de sufrir una diarrea severa, que frecuentemente requiere de hospitalización. La infección en adultos es por lo regular asintomática, aunque ocasionalmente se presentan síntomas en los padres de niños infectados, en pacientes inmunocomprometidos, y en adultos de la tercera edad. La diarrea por rotavirus ocurre principalmente durante los meses de otoño e invierno en los países de climas templados; esta estacionalidad es menos marcada en los países con clima tropical (4).

La sintomatología típica de la infección por rotavirus es diarrea severa (más de 8 evacuaciones al día) acompañada de vómito y puede, o no, cursar con fiebre. Ésta es una enfermedad autolimitada, con una duración promedio de aproximadamente cinco días. La gran mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la severa deshidratación que provoca la infección (5).

El tropismo de los rotavirus está limitado a los enterocitos maduros localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado, causando descamación y muerte celular. Se ha propuesto que, al menos en parte, la diarrea es causada por la proteína viral no estructural NSP4 que estimula la secreción transepitelial de cloro, por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida



de agua. Aparentemente, todo esto sucede previo a la destrucción del epitelio intestinal por la replicación viral (6).

Clasificación

Los rotavirus comprenden un género dentro de la familia *Reoviridae*. Existen varios grupos de rotavirus, dependiendo de sus características antigénicas; hasta ahora se han descrito siete grupos (A-G), que difieren también en sus características epidemiológicas, la especie animal donde más frecuentemente se encuentran y el grupo de edad en la que son más prevalentes. Los grupos A, B, y C se han encontrado tanto en animales como en humanos, y los rotavirus de los grupos D, E, F y G sólo se han aislado de especies animales (5). Los rotavirus del grupo A son los responsables de la gran mayoría de las gastroenteritis tanto en animales como en el hombre y es por eso que son los más caracterizados. En este trabajo nos referimos solamente a los rotavirus del grupo A.

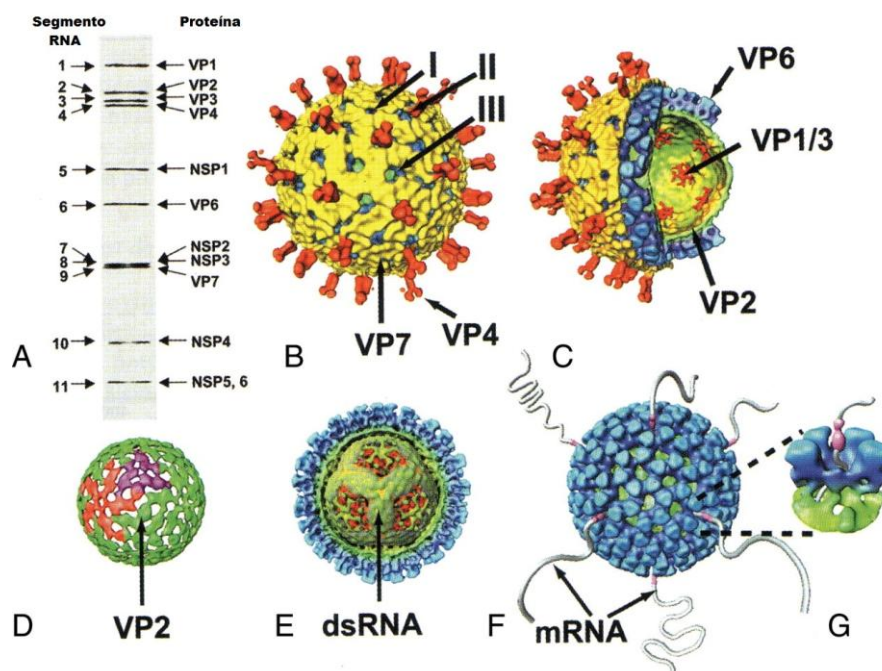
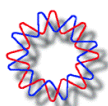


Figura 1.1. Estructura y composición de los rotavirus. (A) Patrón electroforético de los once segmentos de dsRNA del genoma viral, así como las proteínas para las que codifican. (B) Reconstrucción tridimensional de la estructura de un virión maduro (TLP); además, se indican los tres tipos de canales presentes en la estructura de rotavirus (I, II, III); las espículas de VP4 se muestran en rojo y la capa de VP7 en amarillo. (C) Corte de la estructura de Rotavirus (RV) donde se muestra la capa intermedia (VP6 en azul) y la nucleocápside (VP2 en verde) y los complejos VP1/VP3 (rojo) en el interior de la capa de VP2. (D) Organización estructural de la capa de VP2 (en rojo y morado se muestran algunos de los 60 dímeros). (E) RNA genómico en la estructura de RV. Se muestra un corte de las capas de VP2 y VP6 donde queda expuesto el RNA, el cual tiene una apariencia dodecaédrica. (F) Estructura de las DLPs transcripcionalmente activas donde se observa los mRNAs nacientes (gris) saliendo a través de los canales tipo I. (G) Un acercamiento de la vía de salida de los mRNAs en uno de los canales. Tomado de (7).



Características de la Partícula Viral

El virión maduro tiene un diámetro aproximado entre 75 y 100 nm y está compuesto de tres capas concéntricas de proteínas: nucleocápside, capa intermedia y capa externa, juntas forman una estructura icosaédrica y carecen de envoltura lipídica (5).

Existen tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales y funcionales: la partícula completa, que contiene las tres capas proteicas, es también llamada TLP (Triple-Layered Particle) y es la partícula infecciosa ya que las proteínas que conforman la capa externa, VP4 y la glicoproteína VP7, son las responsables de la unión y la penetración del virus a la célula huésped; la partícula que contiene dos capas proteicas o DLP (Double-Layered Particle) no es infecciosa, pero es transcripcionalmente activa; por último, las partículas que contienen una sola capa de proteínas, o nucleocápsides, poseen la actividad de replicar al genoma viral (Figura 1.1) (5). Durante la infección, en el citoplasma celular se forman estructuras llamadas viroplasmos, las cuales son acumulaciones de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP6 y las proteínas no estructurales NSP2, NSP5 y NSP6, así como de RNA viral; en estas estructuras se lleva a cabo la replicación, el empaquetamiento del genoma y el inicio de la morfogénesis del virus (8, 9).

Organización del genoma viral

El genoma viral está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que se transcriben dentro de las DLPs (Figura 1.1A). El RNA mensajero (mRNA) sale de estas estructuras hacia el citoplasma celular por medio de poros formados por la proteína VP2 (Figura 1.1F-G) (10). Los mRNAs virales tienen regiones no traducidas de longitud variable tanto en su extremo 5' como en el 3' flanqueadas por dos secuencias consenso diferentes entre sí y comunes a todos los genes. Por ejemplo, en los rotavirus del grupo A, la secuencia consenso del extremo 3' terminal es UGACC3' y está conservada entre los 11 genes de los virus de este grupo. Los mRNAs virales tienen un cap con la secuencia m⁷GpppG^(m)GP en el extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los mRNAs celulares, no tienen una cola de poliA en su extremo 3'. Cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, excepto el gen 11, el cual contiene dos marcos abiertos de lectura y codifica para dos proteínas (5). Los mRNAs virales pueden cumplir dos funciones: ser traducidos a proteínas o bien, transportados a viroplasmos donde sirven de moldes para la síntesis del RNA genómico de doble cadena (dsRNA).

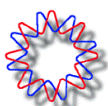
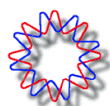


Tabla I. Proteínas de rotavirus^a

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES				
Proteína	Segmento que la codifica	Peso molecular (kDa) ^b	Localización en el virión	Funciones y propiedades
VP1	1	125	Capa interna	Actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, une ssRNA, forma complejo con VP3, interactúa con NSP5
VP2	2	103	Capa interna	Une RNA, es requerida para la actividad de replicasa de VP1, es un dímero, interactúa con NSP5
VP3	3	98	Capa interna	Actividad de guaniltransferasa, metiltransferasa, une ssRNA, forma complejo con VP1
VP4 (VP5*/8*)	4	88 (60/28)	Capa externa	Actividad de hemaglutinina, posee antígenos neutralizantes, sensible a proteasas, incremento de la infectividad por proteasas, virulencia, interacción y anclaje con receptores celulares, forma las espículas virales
VP6	6	45	Capa intermedia	Ensamblaje en trímeros, contiene los antígenos responsables de la clasificación del virus en grupos y subgrupos
VP7	9	37	Capa externa	Glicoproteína integral de la membrana de RE, se ensambla en trímeros, tiene antígenos neutralizantes, une calcio, tiene dos regiones hidrofóbicas en el extremo N-terminal, une Ca ²⁺
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES				
Proteína	Segmento que la codifica	Peso molecular (kDa) ^b	Localización celular	Funciones y propiedades
NSP1	5	58	Citoplasma	Ligeramente básica, tiene dos motivos de dedos de zinc ricos en cisteínas, une RNA, interactúa con IRF e induce su degradación
NSP2	8	37	Viroplasma	Básica, forma octámeros, une ssRNA de manera no específica, actividad de NTPasa, se une a NSP5 y VP1, involucrada en la formación de viroplasma, regula fosforilación de NSP5
NSP3	7	35	Citoplasma	Ligeramente ácida, forma homodímero, se une específicamente a extremo 3' del mRNA de rotavirus, interactúa con eIF4GI
NSP4	10	20	Retículo Endoplásmico (RE)	Glicoproteína transmembranal del RE, enterotoxina, es receptor para la gemación de DLPs a través de la membrana del RE, regula la síntesis de RNA, multifuncional
NSP5	11	22	Viroplasma	Ligeramente básica, glicosilada, rica en serina y treonina, fosfoproteína, interactúa con NSP2 para formar viroplasma, interactúa con VP1, VP2 y NSP6
NSP6	11	11	Viroplasma	Producto del segundo ORF, interactúa con NSP5

^aModificada de (5).^bPredicción del peso molecular de las proteínas de la cepa de rotavirus SA11.

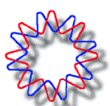
Seis de los genes virales, los genes 1, 2, 3, 4, 6 y 9 codifican para las proteínas estructurales que conforman la partícula viral y que se denominan con el prefijo VP (Viral Protein) VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, respectivamente. Los 5 genes restantes (segmentos 5, 7, 8, 10 y 11) codifican para seis proteínas no estructurales, las que se



denominan con el prefijo NSP (Non Structural Protein) NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6. Estas proteínas, que no forman parte de la estructura del virión, tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula (5, 11). Tanto las proteínas estructurales como las no estructurales son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección (Tabla I).

Ciclo Replicativo

El ciclo replicativo de rotavirus comienza con la unión de las TLPs a receptores de la superficie celular. Este 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 (12). El procesamiento de VP4 es seguido por una serie de interacciones secuenciales y específicas entre las proteínas virales y diferentes proteínas localizadas en la superficie celular. Para algunas cepas de rotavirus la primera interacción con su célula hospedera es con el ácido N-acetilneuroamínico conocido como ácido siálico. Se han descrito varias proteínas celulares que funcionan como receptores o coreceptores de rotavirus entre las que se encuentran: 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 (13-15). 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 las cepas de simio (RRV), de humano (Wa), porcina (TFR-41) y bovina (UK) comparten el requerimiento por algunos receptores como la proteína Hsc70 y el colesterol, sólo tres de ellas (Wa, TRF-41 y UK) entran a la célula huésped a través de la vía endocítica mediada por clatrina (16). El mecanismo por el cual RRV ingresa a la célula huésped aún no está completamente definido y probablemente esté implicada alguna vía endocítica aún no descrita. El proceso de entrada para la mayoría de las cepas de rotavirus requiere de la participación de dinamina, proteína que escinde las vesículas de la membrana celular (17). Una vez unidas a la superficie celular, estas partículas penetran en las células perdiendo la capa más externa, formada por VP7 y VP4, quedando como DLPs, lo cual promueve que se active la transcriptasa viral y se inicie la síntesis de los mRNAs virales (18, 19). Aún se desconoce el mecanismo a través del cual las proteínas de la capa externa de rotavirus se disocian del virión, sin embargo 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 (20). En el interior de las DLPs la polimerasa viral VP1 utiliza los 11 segmentos de



dsRNA como plantillas para sintetizar los mRNAs, los cuales salen a través de canales formados por VP2 y son utilizados ya sea para la síntesis de proteínas virales o como moldes para la síntesis del dsRNA que formará el genoma de la progenie viral (10, 21). Se han identificado tres señales importantes en los mRNAs para la replicación del genoma viral; dos de ellas incrementan la síntesis de dsRNA y una tercera localizada en la región no traducida (UTR, de sus siglas en inglés) 3', es esencial para la síntesis de cadena negativa (5, 22). Los mRNAs, a su vez, se traducen en ribosomas libres en el citoplasma (para la mayoría de las proteínas) o asociadas al retículo endoplásmico para las glicoproteínas NSP4 y VP7 (5).

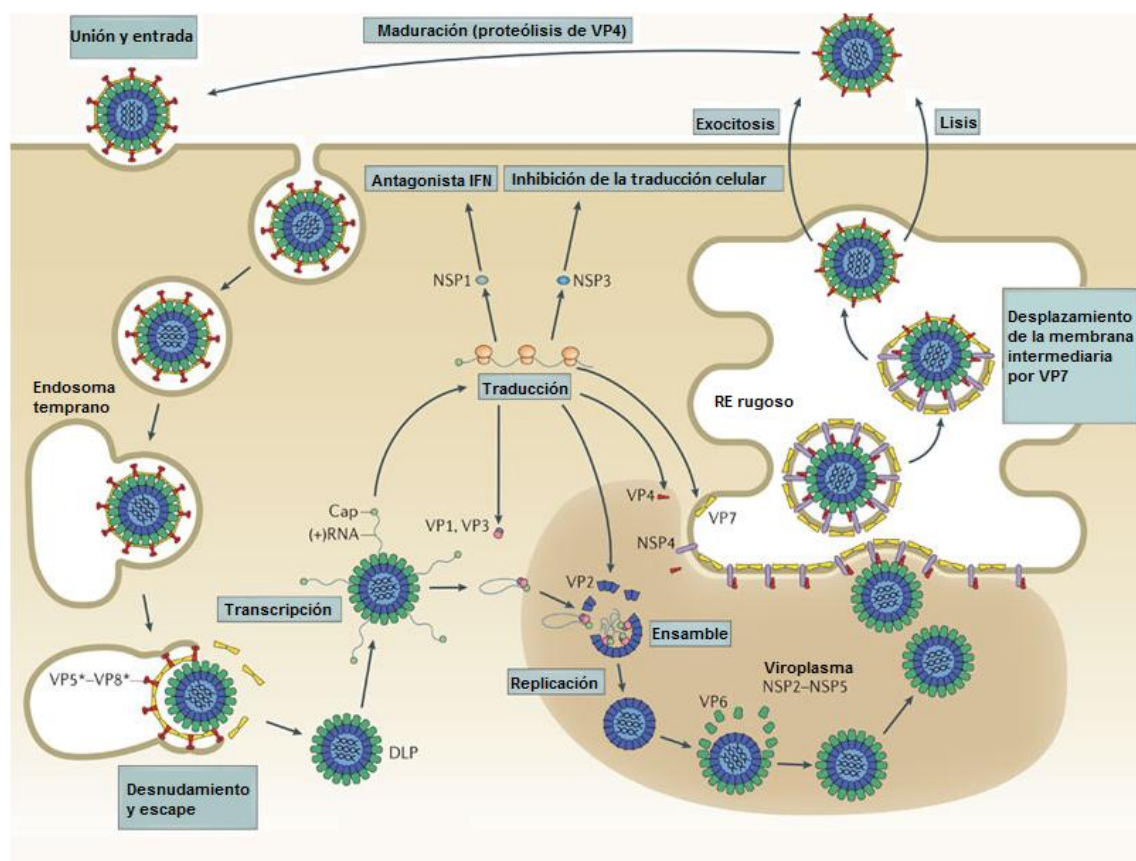
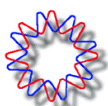


Figura 1.2. Ciclo replicativo de rotavirus. Se muestran las principales etapas del ciclo: la penetración a través de la membrana celular, la transcripción y traducción en el citoplasma celular, la replicación y la morfogénesis viral en viroplasmos y retículo endoplásmico y la salida de rotavirus, por medio de lisis celular y exocitosis. Modificado de (27).

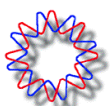
En células infectadas, las proteínas virales NSP2 y NSP5 interactúan entre sí y forman estructuras conocidas como viroplasmos, donde otras proteínas virales y el RNA viral se acumulan y donde se lleva a cabo la replicación y el inicio de la morfogénesis viral (23). La replicación comienza con la formación de intermediarios de replicación (RI),



llamados así por contar con la actividad replicasa. Los RIs llevan a cabo la síntesis del dsRNA utilizando como molde a los mRNAs virales, la síntesis del dsRNA genómico tiene lugar en los viroplasmos. Los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial denominado pre-core RI, el cual carece de actividad de replicación e incluye a las proteínas VP1 y VP3. El pre-core RI, es el precursor del core RI que incluye además de las proteínas del núcleo viral VP1 y VP3, a VP2; este complejo sí tiene actividad de replicación y además puede tener asociadas a las proteínas NSP2 y NSP5 (24). Se ha propuesto que NSP2 puede funcionar como un motor molecular que se une al mRNA viral y cataliza su empaquetamiento en las partículas recién formadas (25). La adición de VP6 da lugar a las DLPs, partículas que poseen actividad de transcripción. Las DLPs maduran a TLPs gemando de los viroplasmos hacia el retículo endoplásmico adyacente, cuya membrana está modificada con las glicoproteínas virales NSP4 (que funciona como receptor de las DLPs) y VP7. Como resultado de la gemación, las partículas adquieren una membrana lipídica transitoria que incluye las proteínas virales NSP4, VP4 y VP7 formando partículas intermediarias. Después, por un mecanismo desconocido, las DLPs pierden la envoltura transitoria de lípidos junto con la proteína NSP4 y retienen selectivamente a las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercera capa proteica, dando lugar a los virus maduros. Finalmente los viriones se acumulan en el lumen del retículo endoplásmico hasta ser liberados. Estudios *in vitro* indican que la liberación del virus ocurre mediante más de un mecanismo, entre ellos lisis celular y/o por la vía de secreción, dependiendo de la línea celular (Figura 1.2) (26, 27).

Rotavirus, como todos los virus, depende completamente de la célula huésped para la síntesis de sus proteínas, ya que su genoma no codifica para ningún componente de la maquinaria de traducción. Durante la infección, se modifican algunas proteínas celulares que participan en el inicio de la traducción, para lograr que los mRNAs virales sean traducidos preferencialmente.

Durante la infección con rotavirus se ha observado que la síntesis de proteínas celulares disminuye considerablemente, mientras que la síntesis de proteínas virales es muy eficiente. Se ha propuesto que la proteína no estructural NSP3 es la responsable de este fenotipo. Conforme avanza la infección, se ha visto que NSP3 interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF4G, mientras la proteína de unión a trectos de poliA (PABP, por sus siglas en inglés) es desplazada de la maquinaria de traducción y junto con ella los mRNAs celulares, lo que favorece que se traduzcan preferencialmente los mRNAs virales (28).



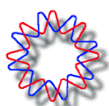
NSP3 es una proteína viral no estructural de 36 kDa, formada por tres dominios funcionales. El dominio amino terminal se une a la secuencia consenso 3' de los mRNAs de rotavirus de manera específica, con alta afinidad ($K_d = 79$ nM) y una baja velocidad de disociación ($t_{1/2} = 8$ hr) (28, 29). El dominio central, que comprende los residuos 150 al 206, es necesario para la dimerización de la proteína y es responsable de la interacción con la proteína celular RoXaN (rotavirus X protein associated with NSP3, de función desconocida) la cual, a su vez, se ha propuesto que interacciona con el citoesqueleto (28, 30, 31). Por último, se encuentra el dominio carboxilo terminal, el cual interacciona con eIF4GI y compite con PABP por el mismo sitio de unión a este factor. Por cristalografía se ha observado que a pesar de que NSP3 y PABP tienen estructuras terciarias muy diferentes, ambas presentan un patrón similar de residuos hidrofóbicos los cuales son determinantes en su interacción con eIF4GI (28, 32, 33).

Síntesis de proteínas

La expresión génica es un proceso que involucra varias etapas, como son la transcripción, traducción y el recambio de RNA y proteínas. El tráfico núcleo-citoplasma también juega un papel esencial en el control de la expresión génica, al ser crítico para procesos celulares como la transcripción, splicing, traducción y control de crecimiento celular (34). La regulación de la expresión génica ocurre a través de múltiples niveles, entre ellos la traducción de los mRNAs. Comparado con la regulación transcripcional, el control de la traducción de los mRNAs ya existentes permite cambios más rápidos en la concentración de las proteínas codificadas y de esta manera, puede ser utilizado para mantener la homeostasis además de modular cambios en el destino y la fisiología celular (35).

La traducción de los mRNAs celulares se lleva a cabo en tres fases: la iniciación, elongación y terminación. La primera de éstas es la más regulada y por tanto es el blanco de acción de muchos virus para inhibir la síntesis de las proteínas celulares (36). En esencia, la fase de iniciación consiste en formar un complejo ribonucleoproteico (RNP), con la finalidad de reclutar al ribosoma en el codón de inicio del mRNA.

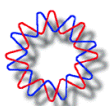
El ribosoma se compone por dos subunidades, la pequeña o 40S y la grande o 60S por su coeficiente de sedimentación. El inicio de la traducción comienza con la disociación de las dos subunidades ribosomales. Los factores de iniciación eIF1, eIF1A y eIF3 participan en esta disociación y se cree que eIF6, una proteína que al asociarse a la subunidad 60S, evita que las subunidades ribosomales se vuelvan a asociar (37, 38).



Una vez que la subunidad ribosomal 40S se encuentra libre, el siguiente paso es la formación del complejo ternario (TC) eIF2-GTP-Met-tRNA_i. La proteína eIF3 junto con eIF1, eIF1A y eIF5 promueven la unión del TC a la subunidad ribosomal 40S, para formar el complejo de pre-iniciación (PIC) 43S, el cual es competente de unirse al mRNA (38, 39).

El siguiente paso consiste en reclutar el mRNA al PIC 43S, acción promovida por eIF3 y el complejo eIF4F, para así formar el PIC 48S (38). El complejo eIF4F está compuesto por las proteínas eIF4E, eIF4A y eIF4G (35, 37, 40). eIF4A es una proteína que se une a RNA de cadena sencilla y tiene actividad de helicasa y de ATPasa dependiente de RNA. La función de esta proteína es la de desaparecer regiones con estructuras secundarias y terciarias en el extremo 5' de los mRNAs; en mamíferos se ha visto que su actividad es estimulada por eIF4B y eIF4H (37, 41, 42). Existen tres isoformas de eIF4A: eIF4AI, eIF4AII y eIF4AIII. En humanos, eIF4AI y eIF4AII tienen 89 % de identidad y son funcionalmente equivalentes, pero muestran una expresión diferencial (43, 44). Por el contrario, eIF4AIII aunque tiene 65 % de identidad a nivel de aminoácidos con eIF4AI, no puede sustituirla en su función (45).

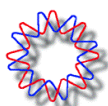
eIF4E es una fosfoproteína que se une específicamente al cap de los mRNAs, el cual generalmente es del tipo m⁷GpppNp, m⁷GpppN^mp o m⁷GpppN^mpN^mp (donde m es un grupo metilo, unido al nucleótido respectivo) y de esta manera localiza el extremo 5' de los mRNAs (37). Se ha propuesto que eIF4E es el factor limitante del complejo eIF4F, ya que es la proteína menos abundante de este complejo en células como la línea celular HeLa, además, su actividad está muy regulada, a nivel de transcripción, por fosforilación y a través de su unión a proteínas inhibitorias (37, 46). En mamíferos eIF4E es fosforilada por la cinasa Mnk1 en la serina 209 (47, 48). Hasta ahora no se sabe con certeza el papel que juega la fosforilación de eIF4E, sin embargo, se ha visto que el estado de fosforilación de eIF4E cambia cuando la célula es sometida a diversos estímulos extracelulares; en la mayoría de los casos, un incremento en la fosforilación, coincide con un incremento en la traducción. Por otra parte, en casos donde la traducción de mRNAs es baja, como sucede durante la mitosis o cuando la célula se encuentra bajo estrés como en choque térmico o infecciones virales, esto correlaciona con una reducción en el estado de fosforilación de eIF4E (49). La fosforilación de eIF4E es determinante para el crecimiento en *Drosophila melanogaster* (50) y se ha visto que durante el inicio de la diferenciación celular, eIF4E se encuentra mayoritariamente en estado fosforilado (51). eIF4E también tiene un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular, su sobreexpresión en células de roedor



genera transformación. Este efecto se ha asociado con su participación en el transporte núcleo-citoplasma del mRNA de ciclina D1, la cual está implicada en el control del ciclo celular (52). Además, eIF4E también tiene un papel en la degradación de los mRNAs (52). Tanto eIF4E como eIF4A se unen a eIF4G, que es una proteína que funciona como un enlace entre el mRNA y la subunidad ribosomal 40S, a través de sus interacciones simultáneas con eIF4E, PABP y eIF3 (Figura 1.3).

El factor eIF4G está compuesto por tres dominios: i) el dominio amino terminal por medio del cual interactúa con eIF4E y PABP; ii) el dominio central, que participa en el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S mediante su unión a eIF3; y iii) el dominio carboxilo terminal, el cual une a Mnk1, la cinasa que fosforila eIF4E. eIF4G contiene dos sitios de interacción con eIF4A que se localizan en el dominio central y en el carboxilo terminal. En mamíferos, eIF4G existe en dos formas funcionalmente homólogas: eIF4GI que representa la forma más abundante, (aproximadamente el 85 %), y eIF4GII. A nivel de aminoácidos, ambas proteínas tienen 46 % de identidad y presentan actividades bioquímicas similares (53). Inicialmente se propuso que eIF4GI y eIF4GII eran funcionalmente intercambiables entre sí, ya que se ha observado que en condiciones donde eIF4GI no se encuentra funcional pero si eIF4GII, la síntesis de proteínas no se inhibe, lo que indica que eIF4GII puede promover el inicio de la traducción eficientemente. Sin embargo, en el caso contrario, cuando eIF4GII no es funcional, la síntesis de proteínas se ve afectada, aún cuando eIF4GI no esté modificado (54). Además, se ha demostrado que durante el inicio de la diferenciación celular, se recluta preferencialmente a eIF4GII en el complejo eIF4F (51), lo cual sugiere que cumple un papel distinto al de eIF4GI.

Además del cap en el extremo 5', la mayoría de los mRNAs eucarióticos contienen en su extremo 3' una extensión formada por nucleótidos del ácido adenílico (poliA), cuya longitud varía de 50 a 300 nucleótidos, a la cual se une PABP. Ésta es una proteína que participa en múltiples eventos celulares que van desde la biogénesis del mRNA, hasta la estabilización y traducción de los mRNAs (55). Su localización es principalmente citoplásmica, sin embargo, se ha visto que cuando se inhibe la transcripción o cuando se sobreexpresa se transloca al núcleo (56). Se ha detectado que PABP puede interactuar con la proteína paxilina, y esta interacción parece ser importante para que PABP se localice en citoplasma (57, 58). Cuando está unida a la cola poliA de los mRNAs, PABP interactúa con eIF4G y esta interacción lleva a la circularización de los mRNAs, lo que a su vez estimula la traducción (Figura 3) (40). Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo la interacción PABP/eIF4G estimula la traducción, entre ellos están: 1) ayudando al



reciclamiento de los ribosomas; 2) estimulando la unión de la subunidad ribosomal 60S; y 3) incrementando la afinidad del complejo eIF4F por el cap (59). También se ha propuesto que esta circularización es un mecanismo que permite detectar la integridad de los mRNAs, especialmente en su extremo 3' (40).

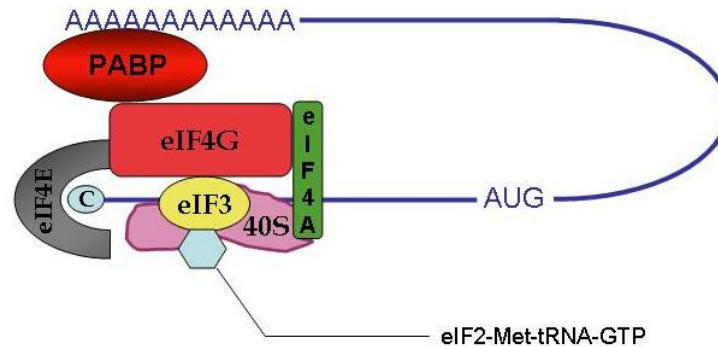
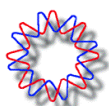


Figura 1.3. Modelo que muestra los principales factores que intervienen en la iniciación de la traducción en los mRNAs de eucariotes que tienen cap y poliA. La subunidad ribosomal 40S unida, entre otros, al complejo eIF3 y al complejo ternario (eIF2-Met-tRNA-GTP), es posicionado en el extremo 5' de un mRNA con cap (círculo azul) y poliA mediante la interacción con eIF4F. El complejo eIF4F está compuesto por la proteína de unión al cap eIF4E (gris), eIF4G (rojo pálido) y eIF4A (verde). La cola poliA es reconocida por PABP (rojo oscuro), la que a su vez se une a eIF4G. Estas interacciones tienen como resultado la “circularización” del mRNA, lo que pone en proximidad los extremos 5' y 3'.

En eucariotes hay dos mecanismos por los cuales los ribosomas se pueden unir al mRNA. En la traducción cap-dependiente (por medio de la cual la mayoría de los mRNAs son traducidos), el primer paso es el reconocimiento del cap por parte del factor de unión al cap eIF4E; como mencionamos previamente, el factor eIF4G sirve como enlace entre el mRNA que contiene el cap y la subunidad ribosomal 40S debido a que interacciona tanto con eIF4E como con la proteína eIF3 la cual a su vez se une a la subunidad ribosomal 40S (37, 40, 60, 61) (Figura 3).

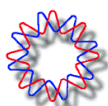
La otra vía para reclutar los ribosomas al mRNA es mediante la unión directa de la subunidad 40S a estructuras secundarias en la UTR 5' conocidas como IRES (de sus siglas en inglés: Internal Ribosome Entry Site). Este mecanismo conocido como cap-independiente, se descubrió inicialmente en picornavirus (62). Los mRNAs de picornavirus carecen de cap y en su lugar tienen regiones 5' no traducidas altamente estructuradas por medio de las cuales se unen a la subunidad ribosomal 40S promoviendo así su traducción, aun en condiciones donde la traducción cap-dependiente está inhibida (61).



Se ha encontrado que los IRES no sólo se encuentran en los mRNAs de picornavirus, sino también en los mRNAs de otros virus e inclusive en algunos mensajeros celulares. Todos los IRES unen a la subunidad 40S de forma interna, sobrepasando la necesidad del cap, sin embargo, no todos requieren los mismos factores para hacerlo. Los requerimientos son muy variados, por ejemplo, los mRNAs del virus de hepatitis A contienen un IRES, sin embargo requieren de todos los factores canónicos de inicio, incluyendo eIF4E; por otra parte, los mRNAs del virus de parálisis del grillo, poseen un IRES mediante el cual pueden iniciar la traducción sin necesidad de ningún factor de inicio ya que su IRES mimetiza a un tRNA y por lo tanto no requiere del tRNA iniciador (61).

Como mencionamos anteriormente, eIF4E es el factor de inicio menos abundante en la mayoría de las células. Esto lo hace un blanco fácil para la regulación de la traducción. Se han descrito diferentes mecanismos para regular la actividad de eIF4E, entre ellos se encuentra su unión a proteínas inhibitoras. Estas proteínas llamadas 4E-BPs (de sus siglas en inglés: eIF4E-Binding Proteins), inhiben la actividad de eIF4E al prevenir su asociación con el factor eIF4G, impidiendo así la formación del complejo eIF4F (37). Las 4E-BPs inhiben la traducción cap-dependiente, mientras que la traducción cap-independiente no se ve afectada (63, 64). La actividad de estas proteínas está regulada por su fosforilación. Las 4E-BPs hipofosforiladas se unen eficientemente a eIF4E en el mismo sitio donde se une eIF4G, mientras que la forma hiperfosforilada tiene poca afinidad por dicho factor (39). Varios estímulos extracelulares (hormonas, factores de crecimiento, mitógenos, citocinas) inducen la fosforilación de las 4E-BPs. Esto es mediado por la vía de señalización que involucra a la PI3K, una cinasa que, en respuesta a estímulos extracelulares, fosforila fosfoinosítidos. Los productos de PI3K, los 3 fosfoinosítidos (3-PIs), reclutan a la membrana a Akt, una cinasa de serinas y treoninas, lo que lleva a su activación. Akt es responsable de fosforilar a mTOR, la cinasa que se encarga de la fosforilación de las 4E-BPs, y por tanto, la que regula directamente su actividad (37, 65-67).

La cinasa mTOR fue identificada como el blanco de rapamicina y de ahí su nombre (Target of Rapamycin). La rapamicina es una droga que inhibe la proliferación de linfocitos y otros tipos de células; este efecto es debido a su interacción con la inmunofilina FKBP12; juntas forman un complejo que bloquea la actividad de la cinasa mTOR y de esta manera se inhibe la síntesis de proteínas, arrojando el ciclo celular en la fase G1. La rapamicina inhibe la traducción cap-dependiente dado que al inactivar a mTOR, ésta ya no es capaz de fosforilar a las 4E-BPs las que a su vez, al encontrarse en forma

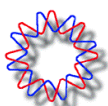


hipofosforilada, se unen a eIF4E en el mismo sitio que el factor eIF4G, inhibiendo la formación del complejo eIF4F (67-69). Sin embargo, el grado de inhibición varía de acuerdo al mRNA, siendo los mRNAs con una región rica en pirimidinas en su extremo 5' los más afectados (69, 70). Además, el grado de inhibición de la síntesis de proteínas global es dependiente de la línea celular (37).

Una vez que la subunidad 40S ha sido reclutada al extremo 5' del mRNA, el PIC recorre el mRNA en busca del codón de inicio AUG. Cuando un codón AUG ha sido reconocido, eIF5 estimula la hidrólisis del GTP unido a eIF2, la subunidad 40S cambia su conformación a un estado cerrado con el Met-tRNA_i localizado en el sitio P y se liberan eIF1, eIF2-GDP y eIF5. Después eIF5B y GTP catalizan la unión de la subunidad 60S del ribosoma para formar el ribosoma 80S y finalmente se liberan eIF5B y eIF1A y comienza la etapa de elongación (35).

Después del reconocimiento del AUG de inicio, eIF2 es liberado como eIF2-GDP; el reciclado de eIF2-GDP, que es inactivo, a eIF2-GTP activo es catalizado por la proteína eIF2B, y es necesario para iniciar otra ronda de traducción. Este proceso de reciclado puede ser regulado mediante la fosforilación de eIF2. La fosforilación de la subunidad α de eIF2, en la serina 51, aumenta su afinidad por eIF2B y al unirse a él, se convierte en un inhibidor competitivo de la actividad de eIF2B; como consecuencia hay una disminución en la cantidad del complejo activo eIF2-GTP, inhibiendo de esta manera el inicio de la traducción. eIF2 α puede ser fosforilada por alguna de cuatro cinasas celulares, que son activadas por algún tipo de estrés específico. La PKR (Protein Kinase Represor) se activa por presencia de RNA de doble cadena en la célula; GCN2 responde a tRNAs no cargados debido a la ausencia de aminoácidos o a luz ultravioleta; HRI, la hemo-represor cinasa, se activa en condiciones de deficiencia de hierro intracelular o durante choque térmico y PERK (PKR-like ER Kinase) es activada cuando las chaperonas del retículo endoplásmico están saturadas o por un exceso de proteínas mal plegadas (39, 71).

Como se mencionó anteriormente, los virus utilizan varias estrategias para manejar la maquinaria de síntesis de proteínas a su favor. A continuación se revisarán algunos de los mecanismos empleados por diferentes virus para manipular la maquinaria de traducción.



Virus y síntesis de proteínas

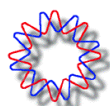
Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que su genoma no codifica los componentes necesarios para la traducción de sus proteínas, y dependen en gran medida de la maquinaria de síntesis de proteína celular para la producción de sus proteínas, por lo que han desarrollado mecanismos sofisticados para garantizar la traducción de sus mRNAs y, en algunos casos, inhibir la síntesis de proteína celular durante la infección (36, 72).

En general, la regulación de la traducción celular se lleva a cabo principalmente en la fase de inicio, más que en la fase de elongación y es en este punto donde los virus han desarrollado varias estrategias para controlar la síntesis de proteína celular.

Algunos virus emplean mecanismos de inicio de traducción en los cuales no utilizan o disminuyen su dependencia de algunos factores del complejo eIF4F y en la mayoría de los casos, estos virus inactivan uno o más componentes de este complejo proteico donde eIF4E y eIF4G son los principales blancos.

Durante la infección por los virus de influenza, el virus de estomatitis vesicular (VSV) y adenovirus, se observa una disminución en la fosforilación de eIF4E lo cual podría contribuir a la regulación de la traducción de los mRNAs celulares (73, 74). En el caso de adenovirus, la proteína viral 100K se une a eIF4G y desplaza a Mnk1, la cinasa encargada de fosforilar a eIF4E, reduciendo de esta manera, la cantidad de eIF4E fosforilado, esto se ha relacionado con una inhibición de la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares (75). Se ha visto que en algunas circunstancias, cuando este factor no está fosforilado, la traducción cap-dependiente de la célula se inhibe (37, 76, 77). Por otra parte, la proteína 100K se une a los mRNAs tardíos de adenovirus en una secuencia específica en la UTR 5', esta región es capaz de reclutar al complejo 43S mediante el apareamiento de bases entre el mRNA viral y el rRNA de la subunidad ribosomal 40S (78).

La regulación traduccional a través del factor eIF4G se ha observado durante la infección por virus de la familia *Picornaviridae*, tales como poliovirus, rinovirus y coxsackievirus, en donde se inhibe la síntesis de proteína celular y se traducen los mRNAs virales de una manera muy eficiente (72). Estos virus codifican para una proteasa conocida como 2Apro que corta específicamente a los factores eIF4GI, eIF4GII y a PABP inhibiendo la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares. Los mRNAs virales se traducen de manera cap-independiente, debido a que poseen un IRES en el extremo 5' el cual dirige la unión del mRNA al ribosoma de manera independiente al complejo eIF4F (72, 79).

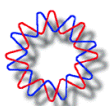


Otra proteína asociada al complejo eIF4F que es blanco de los virus, es la PABP. Proteasas codificadas por lentivirus, enterovirus, y calicivirus procesan a la PABP. Por otra parte la proteína de la cápside del virus de rubéola se une a PABP para de esta manera inhibir la traducción celular (80, 81).

En ocasiones ni la abundancia ni la funcionalidad de estos factores se ve alterada, sin embargo se vuelven espacialmente inaccesibles para los mRNAs celulares al cambiar su localización dentro de las células infectadas. El virus de vaccinia y el virus de la peste porcina africana son virus de DNA que se replican en compartimentos citoplásmicos especializados. Durante la infección por estos virus, eIF4E y eIF4G se redistribuyen a estos compartimentos, lo cual podría favorecer la formación del complejo eIF4F, y por lo tanto la traducción de los RNAs virales y a la vez causar la inhibición de la traducción de los mRNAs celulares (82, 83). De la misma manera, el virus del mosaico del nabo codifica a la proteína VPg la cual se une a eIF4E, concentrándolo junto con eIF4G en sitios de replicación asociados a membranas (84). Otros virus no reclutan estos factores en sitios de replicación, en lugar de eso los relocalizan al núcleo. Por ejemplo, durante la infección por poliovirus, eIF4E es redistribuido al núcleo (85). Se sabe que la traducción de los mRNAs de poliovirus es independiente de eIF4E (86), por lo que su relocalización al núcleo podría contribuir a la inhibición de la traducción de los mRNAs celulares. Normalmente PABP viaja entre el citoplasma y el núcleo, sin embargo en células infectadas por bunyavirus, rotavirus, HSV-1 y KSHV se acumula en el núcleo (81, 87-92), factor que podría ayudar al control de la traducción durante la infección.

Antecedentes del control traduccional en la infección con rotavirus

Como se mencionó anteriormente los mRNAs de rotavirus se caracterizan por tener cap en el extremo 5' y carecer de poliA en su extremo 3'. Durante la infección por rotavirus se observa una severa reducción en la síntesis de proteína celular y se ha propuesto que la proteína viral NSP3 es la responsable de tal fenotipo. Se ha demostrado que el extremo amino terminal de NSP3 se une a la secuencia consenso (GACC) del extremo 3' terminal de los mRNAs virales con muy alta afinidad y especificidad (28-30, 93); además, en su extremo carboxilo terminal se encuentra un dominio que une a la proteína eIF4G, en la misma región en donde se une PABP. En estudios *in vitro*, se ha observado que NSP3 es capaz de desplazar a PABP de su sitio de unión a eIF4G, por lo que se cree que el desplazamiento de PABP por NSP3 es el mecanismo por el cual rotavirus inhibe la síntesis de proteína celular. Además, se ha propuesto que NSP3 al tener



interacciones similares a las de PABP, tales como la unión a eIF4GI y al extremo 3' de los mensajeros virales, podría tener la misma función que dicha proteína celular, es decir, promover la circularización de los mRNAs virales y estimular la síntesis de sus proteínas (Figura 1.4) (28, 30, 32, 33, 94, 95).

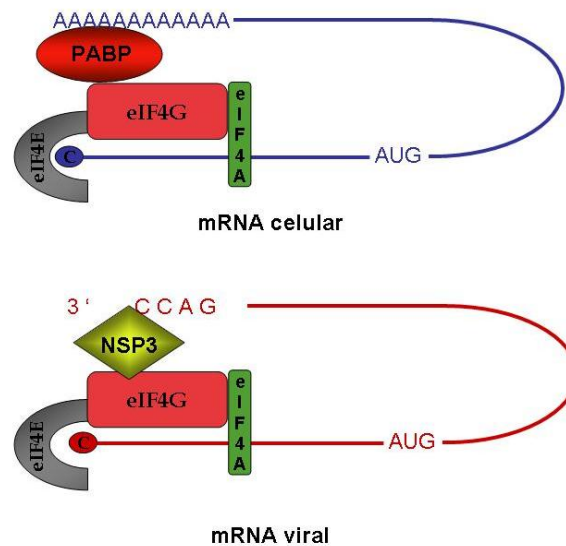
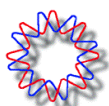


Figura 1.4. Modelo propuesto para el desplazamiento de PABP del complejo eIF4F por NSP3

Recientemente en el laboratorio se silenció la expresión de la proteína viral NSP3 y se observó que no se afecta la síntesis de proteínas virales, y que la síntesis de proteínas celulares ya no es inhibida por la infección. Otro efecto que se encontró al silenciar la expresión de NSP3 fue un incremento de dos a tres veces en la progenie viral, comparando con una infección control, esto debido a un aumento en la replicación del genoma viral (96). En conjunto, estos resultados sugieren que NSP3 no es esencial para la traducción eficiente de los mRNAs virales, sin embargo, si juega un papel importante en la inhibición de la síntesis de proteína celular durante la infección y tiene implicaciones en la replicación del genoma viral. El mecanismo que se había propuesto para la traducción de los mRNAs virales implica la interacción de NSP3 con el factor de inicio de la traducción eIF4GI, sin embargo, como se explico anteriormente es claro que este factor no es necesario para la traducción de los mRNAs de rotavirus (96). También se ha observado que durante la infección por rotavirus, la proteína PABP se acumula en el núcleo de células infectadas, siendo la proteína viral NSP3 necesaria para este fenotipo (91, 92). La fosforilación del factor eIF2 α por la infección por rotavirus también puede contribuir a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares.



HIPÓTESIS

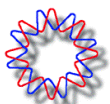
La inhibición de la síntesis de proteína celular en la infección por rotavirus es un proceso multifactorial que involucra, al menos, a la proteína viral NSP3. Bajo estas condiciones de inhibición de la síntesis de proteína celular, el mecanismo de traducción adoptado por el virus podría utilizar diferencialmente factores de inicio de traducción e involucrar a otras proteínas virales en este proceso.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el mecanismo por el cual se regula la traducción de los mRNAs celulares y virales durante la infección por rotavirus.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar el papel de factores canónicos del inicio de la traducción (eIF4E, eIF4A, eIF4GI, eIF4GII y PABP) en el ciclo replicativo viral.
2. Determinar si existen señales en los UTRs de los mRNAs de rotavirus que favorezcan su traducción.
3. Analizar si la localización de los mRNAs celulares durante la infección con rotavirus afecta su traducción.



MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus

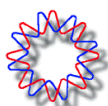
Se utilizó la línea celular MA104 derivada de células epiteliales de riñón del mono *Rhesus*, crecidas en medio mínimo esencial de Eagle (DMEM, HyClone, Logan, UT) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB). La cepa de rotavirus del mono *Rhesus* RRV, fue proporcionada por H.B. Greenberg, Universidad de Stanford, Palo Alto, CA.

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales contra las proteínas purificadas de triple capa (TLPs) de RRV y los dirigidos contra las proteínas virales NSP2 y NSP3 y contra la proteína celular vimentina, fueron producidos en el laboratorio. El anticuerpo monoclonal dirigido contra VP2 (3A8) fue obsequiado por H. B. Greenberg. Los anticuerpos monoclonales para eIF4E y PABP y el policlonal para eIF4GI, fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); el anticuerpo policlonal que reconoce eIF4AI se obtuvo de Cell Signaling (Danvers, MA). El anticuerpo policlonal dirigido contra la región amino terminal de eIF4GII fue donado por el Dr. N. Sonenberg, Universidad McGill, Montreal, Canadá; el anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa y el suero policlonal de conejo anti-IgG de ratón fueron obtenidos de Zymed (San Francisco, CA); el suero anti-conejo acoplado a peroxidasa se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos anti-conejo acoplado a Alexa 568 y anti-ratón acoplado a Alexa 488 se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR). El suero policlonal de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa se adquirió de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA).

Infección de células y titulación de la progenie viral

Las células transfectadas se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 5 virus por célula y se incubaron a 37°C por distintos tiempos. Para medir el rendimiento viral, las células se lisaron a las 14 horas postinfección (hpi), mediante dos ciclos de congelación-descongelación, y los lisados obtenidos se activaron con tripsina (10 µg/ml) durante 30 minutos (min) a 37°C. A partir de estos lisados se realizaron diluciones seriadas que se utilizaron para infectar monocapas de células crecidas en placas de 96 pozos, dejando adsorber una hora (h) a 37°C. Los pozos se lavaron una vez con MEM sin SFB y se incubaron de 14 a 16 h a 37°C. Después de esta incubación, se retiró el medio de cultivo



a las células y se fijaron con acetona al 80 % en PBS durante 30 min; transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS. Las células fijadas se incubaron con suero policlonal anti-TLPs a una dilución de 1:5000 (v:v) en PBS por 1 h a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron por 1 h a 37°C con proteína A-peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a una dilución 1:3000 (v:v) en PBS. Para revelar las células infectadas se usó 3-amino-9-etil-carbazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como sustrato para la peroxidasa. La determinación del título viral se llevó a cabo contando las células teñidas (focos infecciosos) en cada dilución.

siRNAs

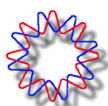
Los siRNAs dirigidos contra las proteínas eIF4E, eIF4GI, eIF4GII, NSP3 y GFP (control irrelevante), (Tabla II) y los siRNAs SMART pool dirigidos específicamente contra eIF4AI o PABP se obtuvieron de Dharmacon Research (Lafayette, CO).

Tabla II. Secuencia de los siRNAs utilizados

Gen	Secuencia siRNA	Nucleótidos	GenBank
eIF4E	GGAGGUUGCUAACCCAGAA (sentido)	933-951	NM_001968
	UUCUGGGUUAGCAACCUCC (antisentido)		
eIF4GI	AAUUGGCUGAGGACAUGGAAA (sentido)	4245-4265	NM_182917
	UUUCCAUGUCCUCAGCCAAUU (antisentido)		
eIF4GII	GGUCCUUUUUAUCCUGGAC (sentido)	533-551	NM_003760
	GUCCAGGAUAAAAAGGACC (antisentido)		
NSP3	AAUUGGAUGACUGACUCUCGA (sentido)	281-301	AY065842
	UCGAGAGUCAGUCAUCCAAUU (antisentido)		
GFP	AACUUACCCUGAAGUUCAUCU (sentido)		
	AGAUGAACUUCAGGGUAAGAA (antisentido)		

Plásmidos

El plásmido pGEM-vFv se construyó con el siguiente protocolo: el marco de lectura abierto (ORF) que codifica para la luciferasa de luciérnaga del plásmido pGL3 Basic (Promega, Madison, WI) y rodeada por las UTRs 5 y 3' del gen 6 de RRV, se introdujo en los sitios KasI y SmaI del plásmido pGEM3Z (Promega). Se utilizaron los oligonucleótidos KasT7-5'fw y 5ATGSpeRev (Tabla III) para introducir la UTR 5' de VP6 precedida por el promotor de T7 y con un sitio SpeI en su extremo junto al ATG del gen de



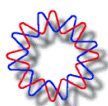
luciferasa de luciérnaga (Luc). El gen Luc se amplificó utilizando los oligos 5' lucSpeI and 3' luc BglIII (Tabla III) que introdujeron sitios SpeI y BglIII en el extremo 5' junto al ATG y después del codón de paro del ORF de Luc respectivamente; la UTR 3' del gen 6 se amplificó mediante PCR utilizando los oligos VP63'fw y YM6-3' (Tabla III) los cuales introdujeron sitios BglIII y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente.

El plásmido pBF-cRc se construyó subclonando el ORF digerido de luciferasa de *Renilla* del plásmido pRL-CMV (Promega) con XbaI, el plásmido linearizado se trató con T4 DNA polimerasa para convertir los extremos cohesivos en romos y después se digirió el plásmido con NheI. Después de hacer una purificación de gel, el fragmento se ligó al vector de expresión pOO2 (proporcionado amablemente por O. Pantoja, Instituto de Biotecnología, UNAM, Mex) el cual contiene las UTRs 5' y 3' de β -globina de *Xenopus laevis* (GenBank: NM_001096347.1), y que previamente se digirió con XbaI y PvuII. En el plásmido pOO2, la UTR 5' del gen de globina está precedido por un promotor de SP6, y al final de la UTR 3' se encuentran 60 adeninas seguidas por un sitio MfeI. Todas las construcciones se verificaron por secuenciación. Un esquema de los mRNAs generados con estas construcciones se muestra en la figura 2.8A.

El plásmido pTK-GLuc que contiene la secuencia que codifica para Luciferasa de *Gaussia* (Gluc) se obtuvo de New England BioLabs (Ipswich, MA).

Transcripción in vitro de mRNAs

Para obtener los mRNAs del gen 10 de rotavirus y vFv, los plásmidos pGEM-NSP4 (97) y pGEM-vFv se linearizaron con SacII (New England BioLabs, Ipswich, MA), se purificaron con fenol-cloroformo y precipitaron con etanol. Los plásmidos linearizados se utilizaron como templados para la transcripción *in vitro* utilizando el kit MEGAscript T7 (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en presencia de un análogo de cap $m^7G(5')ppp(5')G$ (New England Biolabs, Ipswich, MA). De manera similar el mRNA del plásmido pBF-cRc se obtuvo por transcripción *in vitro* a partir del plásmido linearizado con MfeI, utilizando el kit MEGAscript SP6 (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en la presencia de un análogo de cap. Para transcribir *in vitro* la región codificante de Gluc, se utilizaron los oligonucleótidos Kas/T7/Gluc y Gluc/MfeI (secuencias en Tabla III), para amplificar el ORF Gluc por PCR e introducir un promotor para T7 en el extremo 5' y un sitio MfeI en el extremo 3'. El producto de PCR se digirió con MfeI, se trató con proteinasa K (2 mg/ml) y se extrajo con fenol-cloroformo. El producto de PCR purificado



se utilizó como templado para transcripción *in vitro* usando el kit MEGAscript T7, en presencia de un análogo de cap como se mencionó previamente. Después de la transcripción el mRNA Gluc se poliadeniló *in vitro* utilizando la PoliA polimerasa de *E. coli* (New England BioLabs) por 20 min a 37°C. El incremento en tamaño del transcrito poliadenilado se verificó corriendo el mRNA en un gel de agarosa al 1 % en buffer TAE.

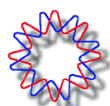
Tabla III. Secuencia de los oligonucleótidos usados para creación de plásmidos.

Oligonucleótido	Secuencia 5'- 3'
KasT7-5'fw	AGC AGA TCT AGG ACC AAG CT
5ATGSpeRev	GCG ACT AGT CAT GTT GAA GAC TTC GTT
5'lucSpeI	ACG CAC TAG TGA AGA CGC CAA AAA C
3'lucBglII	GGA AGA TCT ACA ATT TGG ACT TTC CG
VP63'fw	AGC AGA TCT AGG ACC AAG CT
YM6-3'	CAG ACC CGG GCC GCG GTC ACA TCC TCT CAC T
Kas/T7/Gluc	CGC GGC GCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCT TGG TAC
Gluc/MfeI	GAA TGC AAT TGT TGT TGT TAC

Transfección de siRNAs

La transfección de los siRNAs se llevó a cabo en monocapas de células MA104 confluentes crecidas en placas de 48 pozos. Se mezclaron 2µl de lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) por cada 100 µl de siRNAs (a una concentración de 600 pmol/ml) en MEM sin antibióticos, y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Después de esta incubación se adicionó la mezcla de transfección a las células y se incubaron por 8 h a 37°C, al cabo de este tiempo las células se lavaron con DMEM con 5 % de SFB y se incubaron por 72 h antes de la infección con rotavirus. Para obtener el efecto específico de los siRNAs que no habían sido utilizados previamente en el laboratorio, se ensayaron varias concentraciones a diferentes tiempos de transfección, con lo cual se determinó la condición donde se obtiene el silenciamiento óptimo de la expresión de cada proteína blanco.

La transfección del siRNA^{NSP3} se llevó a cabo utilizando el método de transfección reversa. Brevemente, se preparó una mezcla de oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) (15 µl/ml) y 200 pmol/ml del siRNA en MEM. Esta mezcla se incubó en placas de 48 pozos por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 200 µl de una



suspensión de células MA104 por pozo (1.5×10^5 células/ml) y se incubaron por 48 h a 37°C. Después de este tiempo las células se infectaron a una MOI de 5.

Transfección de Plásmidos

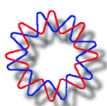
El plásmido pTK-GLuc se transfectó en monocapas de células confluentes utilizando Lipofectamina LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA). Brevemente, células MA104 crecidas en placas de 48 pozos, previamente lavadas con MEM, se incubaron por 3 h a 37°C con una mezcla de Lipofectamina LTX (40 µg/ml) y 7.5 µg/ml del plásmido. Después de este tiempo, la mezcla de transfección se reemplazó por MEM, y las células se incubaron por distintos tiempos antes de ser cosechadas.

Transfección de RNA

Para lipofectar mRNAs transcritos *in vitro*, células crecidas en cajas de 48 pozos se incubaron por 3 h a 37 °C con una mezcla que contiene Lipofectamina 2000 (40 µg/ml) (Invitrogen) y 2.5 µg/ml de mRNA en MEM. Después de este tiempo, se removió la mezcla de transfección, las células se lavaron 4 veces con MEM y se incubaron por 30 min a 37°C con una solución 10 mg/ml de RNasa A en MEM, para eliminar cualquier RNA unido de manera inespecífica a las células. Al terminar el tiempo de incubación, las células se lavaron 4 veces con BSA al 1 % en MEM y 4 veces con MEM y se incubaron por distintos tiempos a 37°C. La infección de células transfectadas se realizó agregando el virus inmediatamente después de los lavados recién descritos.

Western blot

Se prepararon extractos celulares lisando las células con buffer de lisis (25 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mM Tris (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól (DTT), 10 % glicerol, y 1 % Tritón X-100, suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free; Roche)). Los lisados celulares se centrifugaron por 5 min a $10,000 \times g$ y se colectaron los sobrenadantes. Las muestras se diluyeron en buffer Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 2 % de SDS, 0.1 % de azul de bromofenol, 10 % de glicerol y 0.5 % de 2 β-mercapto-etanol), se hirvieron por 5 min antes de separar a las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Las membranas se bloquearon con una solución al 5 % de leche descremada (Carnation, Nestlé, Vevey, Suiza) en PBS-



0.1 % Tween. Al finalizar el tiempo de bloqueo se incubó la membrana con el anticuerpo correspondiente y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-0.1 % Tween, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a peroxidasa. Al finalizar la incubación se lavó tres veces con PBS-0.1 % Tween. Los anticuerpos marcados con peroxidasa se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Ligthning™, siguiendo las instrucciones del proveedor (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) y exponiendo la membrana a placas fotográficas X-Omat (Kodak, Rochester, NY) durante diferentes tiempos. Los anticuerpos marcados de manera fluorescente se visualizaron en un Typhoon Trio (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageQuant TL.

Marcaje metabólico

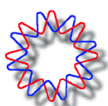
Las células transfectadas con el siRNA correspondiente se marcaron con [³⁵S] a diferentes tiempos, para esto, el medio se reemplazó por MEM sin metionina suplementado con la mezcla de marcaje Express [³⁵S] a una concentración de 25 µCi/ml (Dupont NEN, Wilmington, DE) y se incubó por 30 min. Posteriormente, las células se lisaron como se describió anteriormente y las muestras se analizaron por SDS-PAGE. La concentración de proteínas se ajustó por tinción con azul de coomassie y, finalmente, los geles se secaron y se expusieron para autorradiografía.

Cuantificación de incorporación de marca por precipitación con TCA

Diez µl de lisado celular se mezcló con 100 µl de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M, vigorosamente. Después de incubar 5 min a 37°C, 50 µl de esta solución se pasó por papel filtro y se dejó secar. El papel filtro se incubó en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % v:v en agua, por 3 min a 4°C. Después se lavó dos veces en esta solución por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con etanol al 95 % v:v en agua. El papel filtro se dejó secar, para finalmente colocarlo en líquido de centelleo Ecolite (ICN, Costa Mesa, CA). La cantidad de radioactividad incorporada se detectó en un contador de centelleo (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA).

Inmunofluorescencia

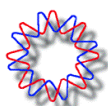
Las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio, se transfectaron con el siRNA correspondiente como está descrito anteriormente y 48 h postransfección las células se



infectaron a una multiplicidad de 3. A las 6 hpi, las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS por 20 min. Después de este tiempo, las células se lavaron tres veces con una solución de NH_4Cl 50 mM en PBS (PBS/ NH_4Cl), la cual se utilizó posteriormente en todos los lavados. Las células se permeabilizaron con PBS-0.5 % Tritón X-100-50 mM NH_4Cl por 15 min y después se lavaron tres veces. Las células se dejaron bloqueando toda la noche en una solución de bloqueo (BSA al 1 % en PBS/ NH_4Cl) a 4°C. Posteriormente, los cubreobjetos se incubaron por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo. Las células se lavaron 4 veces con PBS/ NH_4Cl por 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a un fluoróforo (Alexa), por una hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron por 15 min con una solución de DAPI 30 nM, para la tinción de núcleos y se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS/ NH_4Cl ; posteriormente, los cubreobjetos, se montaron en portaobjetos de vidrio con Fluoprep (BioMérieux, Inc., Durham, NC). Se analizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon E600 acoplado a una cámara digital DM1200 (Nikon, Tokyo, Japón).

RT-PCR en tiempo real

Las células se transfectaron con siRNAs y se infectaron con rotavirus RRV, como se describió anteriormente. A los tiempos indicados, las células se lisaron con Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), y el RNA total se purificó, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El RNA total purificado de los lisados celulares se trató con DNAsa libre de RNAsas (Roche, Basel, Suiza) para eliminar cualquier posible contaminación con DNA. El nivel de los mRNAs de luciferasa de luciérnaga, luciferasa de *Renilla*, luciferasa de *Gaussia*, grp94, grp78 y GAPDH se determinó mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) de acuerdo al protocolo implementado por Ayala-Bretón (97); los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones se muestran en la Tabla IV. Cada tubo de reacción contenía 100-200 ng de RNA total, 10 μl de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.1 μl de Transcriptasa reversa 50 U/ μl (Applied Biosystems), 0.16 μl de inhibidor de RNasa 40 U/ μl RNasin (Promega, Madison, WI) y 1.6 μl de oligos (2.5 pmol/ μl) en un volumen final de 20 μl . Las amplificaciones se realizaron empleando el siguiente protocolo: transcripción reversa 30 min a 48°C; inactivación de la transcriptasa reversa 10 min a 95°C; PCR: 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 min; fase de disociación de 60°C a 95°C por 30 min; en el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). Los



resultados se normalizaron con los niveles de RNA mensajero de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en cada muestra. Las veces de aumento o disminución se calcularon utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (98).

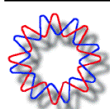
Tabla IV. Secuencia de los oligonucleótidos usados para qRT-PCR

Gen	Oligo Sentido	Oligo Antisentido
Luciferasa de Luciérnaga	GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT	ACACCTGCGTCGAAGATGT
Luciferasa de <i>Renilla</i>	GTGCCACATATTGAGCCAGT	CCATTACCAGATTTGCCTGA
Luciferasa de <i>Gaussia</i>	CACGCCCAAGATGAAGAAGT	TTGAACCCAGGAATCTCAGG
Grp94	TCCGCCTTCCTTGTA GCAGATA	TTGTCGTTCCCCGT CCTAGA
Grp78	ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	TGCCGTAGGCTCGTTGATG
GAPDH	ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT
Gen 10 de RRV	TCCTGGAATGGCGTATTTTC	GAGCAATCTTCATGGTTGGAA
rRNA 18S	CGAAAGCATTGGCCAAGAAT	GCATCGTTTATGGTCCGAAC

Cuantificación del mRNA viral

Dado que el genoma de rotavirus es de RNA de doble cadena (dsRNA), el amplificar el RNA viral utilizando al mismo tiempo un par de oligos no nos permitiría distinguir las cantidades de RNA(+) y RNA(-) (ya que tienen la misma secuencia sólo que complementaria). Por lo tanto, para cuantificar de forma específica las hebras positiva y negativa del RNA del gen 10 de rotavirus, se realizó una amplificación del RNA viral en dos pasos: En el primer paso, se realizó una reacción de transcriptasa reversa utilizando únicamente el oligonucleótido complementario a la cadena que se deseaba cuantificar, usando la siguiente mezcla de reacción: 100-200 ng de RNA total (hervido por 5 min y enfriado en hielo inmediatamente después), 10 μ l de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0.1 μ l de Transcriptasa reversa 50 U/ μ l (Applied Biosystems), 0.16 μ l RNAsin 40 U/ μ l (Promega) y 0.8 μ l de oligo (2.5 pmol/ μ l) en un volumen final de 19.2 μ l. La reacción se llevó a cabo a 48° C durante 30 min y, posterior a esto, las muestras se incubaron a 90° C por 10 min y se enfriaron en hielo, esto con el fin de inactivar a la transcriptasa reversa.

El siguiente paso consistió en la amplificación del cDNA recién sintetizado, mediante PCR. Para ello, 0.8 μ l del oligo complementario (2.5 pmol/ μ l) se agregó a la mezcla de reacción para un volumen final de 20 μ l. La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo 7500 Real Time PCR System utilizando el protocolo previamente descrito para



PCR. Finalmente, se determinó el Ct de cada muestra con el software 7500 system SDS detection.

El RNA puede ser cuantificado en forma absoluta y relativa. La primera consiste en calcular la cantidad exacta (e.g. en nanogramos o número de copias por célula) del RNA blanco. La segunda consiste en determinar cuántas veces más hay de RNA blanco entre una muestra y otra. Es importante mencionar que en ambos tipos de cuantificaciones, la cantidad de RNA de polaridad negativa será expresada como dsRNA, ya que el RNA negativo únicamente se encuentra presente de esta forma. Mientras que la cantidad de mRNA viral es determinada al restarle a la cantidad de RNA viral de polaridad positiva calculada, la cantidad de RNA viral de polaridad negativa cuantificada para el mismo gen. Es decir, mRNA viral = RNA positivo – RNA negativo. Debido a que el RNA de polaridad positiva puede encontrarse tanto como mRNA como dsRNA (97).

A continuación se describirán las dos formas de cuantificar al RNA mediante RT-PCR en tiempo real:

Cuantificación absoluta

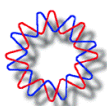
La cantidad de RNA viral, ya sea de dsRNA o mRNA, se determinó al extrapolar el Ct obtenido de las muestras con cantidad de RNA viral desconocido contra una curva estándar generada a partir de muestras con una concentración conocida de mRNA viral puro.

Cuantificación relativa

El Ct obtenido al amplificar el RNA negativo o positivo se utilizó para calcular el incremento mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este método consiste en lo siguiente (98):

- 1) El RNA de cada condición se amplifica con los oligos dirigidos contra el gen de interés y contra el gen que servirá como control endógeno (en este trabajo utilizamos GAPDH).
- 2) Calcular el Ct para la amplificación de cada muestra (problema y control endógeno)
- 3) $\Delta Ct = Ct$ de la muestra a amplificada con los oligos para el gen $x - Ct$ de la muestra a amplificada con los oligos para el gen control endógeno.
- 4) Después, se determina el valor del $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ de la muestra $a - \Delta Ct$ de la referencia, que es la muestra contra la que se desee determinar los incrementos (e.g. T0).
- 5) Los valores de incremento o decremento se calculan de la siguiente forma: Incremento = $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Debido a esto, el valor de la muestra de referencia llevará el valor de 1.



En este trabajo, la cantidad de RNA fue normalizada contra la cantidad de mRNA de GAPDH.

Ensayos de luciferasa

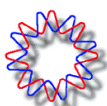
Células MA104 que se transfectaron con mRNAs que expresan luciferasa de luciérnaga o luciferasa de *Renilla* se lisaron con el buffer de lisis del kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI). Los lisados celulares se dividieron en dos partes, una parte se utilizó para extraer el RNA con Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La otra parte del lisado celular se utilizó para determinar la actividad de las dos luciferasas con el kit mencionado. Por otra parte las células MA104 que se transfectaron con el plásmido pTK-GLuc o con mRNAs que expresan luciferasa de *Gaussia* se les retiró el sobrenadante con el cual se midió la actividad de luciferasa de *Gaussia* utilizando el kit The BioLux *Gaussia* Luciferase Assay Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA), y las células se lisaron con Trizol para extraer el RNA total. La actividad de los diferentes tipos de luciferasa se determinó utilizando el luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory, Ann Arbor, MI).

Preparación de extractos citoplásmicos y nucleares

Células MA104 se cosecharon por tripsinización, se lavaron dos veces con PBS y se colectaron por centrifugación. Las células se resuspendieron y lisaron mediante incubación con el Buffer 1 (25 mM HEPES, pH 7.9, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 % v:v NP-40 suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete; Roche)) por 15 min a 4°C. Los núcleos se cosecharon por centrifugación (5000 rpm, 5 min), y el sobrenadante se colectó como el extracto citoplásmico. Los núcleos se lavaron una vez en el Buffer 2 (25 mM HEPES, pH 7.9, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.25 % v:v NP-40 suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas). El RNA total se purificó de cada una de las fracciones con Trizol Reagent. La identidad de las fracciones se corroboró mediante detección por western blot de las proteínas lámina A/C (núcleo) y hsc70 (citoplasma).

Cuantificación de mRNAs poliadenilados

Después de extraer el RNA total de los extractos citoplásmicos y nucleares, los mRNAs poliadenilados se purificaron de estas fracciones con el kit Oligotex Direct mRNA mini kit (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La



concentración de los mRNAs eluidos se determinó por absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Preparación de RNAs con o sin PoliA para hibridación

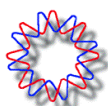
De 10 a 13 ug de RNA total se mezclaron (o no) con 500 pmol de oligo-dT₁₅, y se incubaron a 65°C por 8 min. Posteriormente, a esta mezcla se le agregó 1U de RNasa H (NEBiolabs, Ipswich, MA), 40U de RNasin (Promega, Madison, WI) y buffer de RNasa H (para una concentración final 1X), y se incubó a 37°C por 30 min. Finalmente el RNA se extrajo con Trizol y se separó por electroforesis en gel para posteriormente someterse a ensayos de Northern blot.

Northern blot

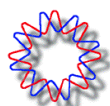
El RNA total se extrajo con Trizol, después se mezcló con 2X RNA Loading Dye (Fermentas, Life Technologies) y se incubó por 15 min a 65°C antes de separarlo mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 0.8 %. El RNA separado por electroforesis se incubó por 30 min en NaOH 0.05 M y después en SSC 20X (3 M de NaCl, 0.3M de Citrato de Sodio) por 45 min. Posteriormente se transfirió a membranas Hybond-N⁺ (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La membrana se incubó por 15 min en NaOH 0.05 M antes de ser radiada por luz UV para inmovilizar el RNA. Después, la membrana se pre-hibridó por al menos 30 min con la solución ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) a 42°C. Al finalizar esta incubación la membrana se hibridó por al menos 10 h a 42°C con un oligonucleótido complementario al mRNA de grp78 marcado con ³²P, el cual se marcó utilizando la enzima T4 Polynucleotide Kinase (NEBiolabs, Ipswich, MA). Transcurrido el tiempo de hibridación se realizaron dos lavados con una solución 2X SSC/ 0.1 % SDS por 30 min a 42°C y finalmente la membrana se secó, expuso y analizó en un Typhoon 8600 phosphorimager.

Cromatografía con cap

Células MA104 se lavaron con PBS y posteriormente se lisaron en buffer NLB (50 mM HEPES pH 7.5, 100mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 0.5 % v:v IGEPAL A-630 suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete; Roche)). Posteriormente los lisados se clarificaron por centrifugación a 14000 g por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se preaclaron con resina sefarosa 4B (GE



Healthcare, Buckinghamshire, UK) por 20 min. El sobrenadante preaclorado se incubó con 7-Methyl GTP-Sepharose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) por una hora, posteriormente la resina se lavó 4x con buffer NLB para al final resuspenderse en NLB adicionado con GTP a una concentración final de 1 mM.



RESULTADOS

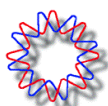
Papel de los componentes del complejo eIF4F en la traducción de los mRNAs celulares

El inicio de la traducción es un proceso muy regulado y uno de los principales puntos de control es el complejo eIF4F. Los virus son parásitos intracelulares que dependen de la maquinaria de traducción celular para producir sus proteínas y una de las estrategias más comunes utilizadas para lograr que sus mRNAs sean traducidos mientras se inhibe la traducción de los mRNAs celulares es la de modificar el complejo eIF4F.

Se sabe que durante la infección por rotavirus, PABP es desplazada del complejo eIF4F, sin embargo, no se ha observado si el virus interfiere de otra manera con la función de este complejo y qué tan importante es éste para el progreso de la infección. Con este fin se decidió estudiar el papel de la proteínas que forman parte del complejo eIF4F que son eIF4E, eIF4GI y su homólogo eIF4GII, eIF4AI y PABP sobre la síntesis de proteínas virales; para lo cual se silenció la expresión de cada una de estas proteínas utilizando el método de RNA de interferencia (RNAi). En estos ensayos, las células MA104 fueron transfectadas con siRNAs dirigidos contra cada una de estas proteínas o contra una secuencia irrelevante (siRNA^{Irre}) como control, fueron infectadas o no con RRV y marcadas metabólicamente con [³⁵S]. Se analizó el efecto de interferir la expresión de estas proteínas sobre células sin infectar, cuantificando la incorporación de radioactividad en células interferidas. En la figura 2.1 observamos que cuando se inhibió la expresión de estos factores, la síntesis de proteínas celulares disminuyó alrededor del 40 %, siendo la interferencia simultánea de eIF4GI y eIF4GII la que más afectó, al reducir en casi 60 % la síntesis de proteínas celulares.

Papel de los componentes del complejo eIF4F en el ciclo replicativo de rotavirus

Una vez que caracterizamos el efecto que tiene la inhibición de la expresión de los factores eIF4E, eIF4GI, eIF4GII, eIF4AI y PABP sobre la síntesis de proteínas celulares, se analizó el resultado de estos tratamientos sobre la producción de proteínas virales durante la infección. Con este fin, las células tratadas con los distintos interferentes se cosecharon a 3, 6 y 9 hpi y después se realizó la inmunodetección de las proteínas virales, y se cuantificaron por densitometría.



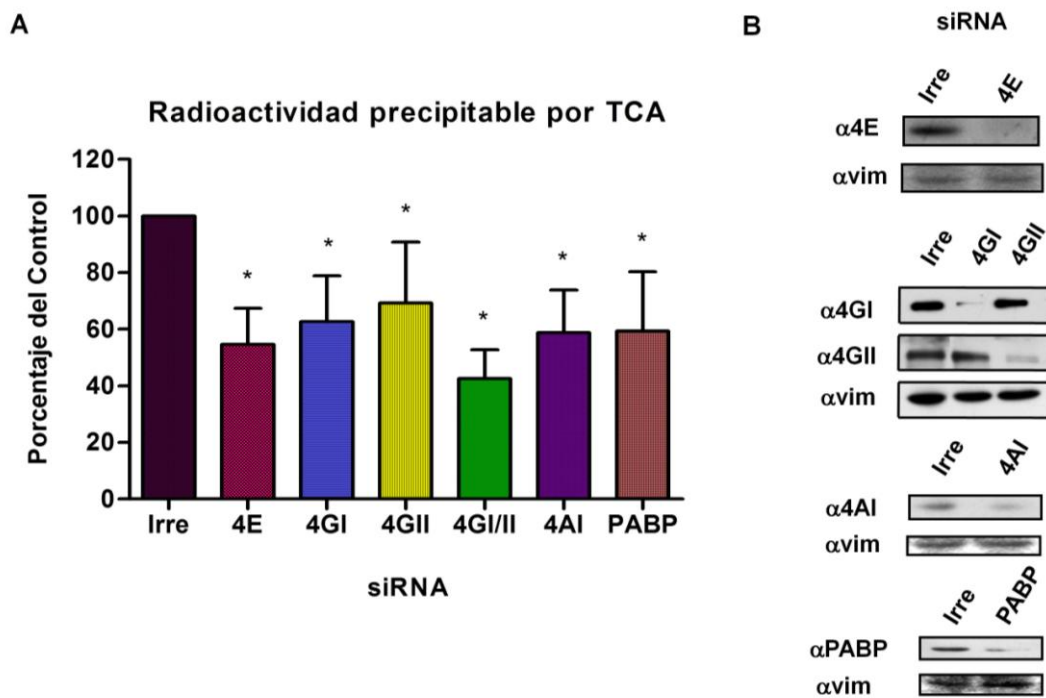
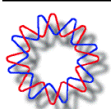


Figura 2.1. Síntesis de proteínas celulares al inhibir la expresión de los factores del complejo eIF4F y PABP. Células MA104 fueron transfectadas con siRNA^{eIF4E} (4E), siRNA^{eIF4GI} (4GI), siRNA^{eIF4GII} (4GII), una mezcla de los dos anteriores (4GI/II), siRNA^{eIF4AI} (4AI), siRNA^{PABP} (PABP) o un siRNA irrelevante (Irre) como control y 72 h postransfección (hpt) fueron cosechadas. A) Las células se marcaron metabólicamente con [³⁵S] 30 min antes de la cosecha. La incorporación de radioactividad en proteínas fue determinada por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y normalizada con la cantidad de proteína total cuantificada por el método de Bradford. El 100 % es la incorporación obtenida en células transfectadas con el siRNA control. B) Inmunodetección de eIF4E, eIF4AI, PABP, eIF4GI y eIF4GII. La gráfica muestra el promedio de tres experimentos y la desviación estándar entre ellos.

Como se ha mencionado previamente, los mRNAs virales contienen cap pero no cola poliA, por lo que esperaríamos que su traducción fuese cap-dependiente y por lo tanto requiriera de la proteína de unión al cap, eIF4E y a su vez, fuese independiente de PABP. Lo que observamos es que a tiempos tempranos en la infección (3 hpi), la traducción de los mRNAs virales parece verse afectada por la reducción en la cantidad de eIF4E, sin embargo, interesantemente, este efecto parece disminuir y desaparecer conforme avanza la infección, dado que a 6 hpi la producción de proteínas virales se ve menos afectada que a 3 hpi; y a 9 hpi ya no observamos ningún efecto (Figura 2.2A y 2.2C). Esto sugiere que la traducción de los mRNAs virales pudiera llevarse a cabo de una manera cap-dependiente al inicio de la infección, cuando comienza el ciclo de replicación del virus y a medida que progresa la infección su traducción se va haciendo independiente de ciertos factores celulares.



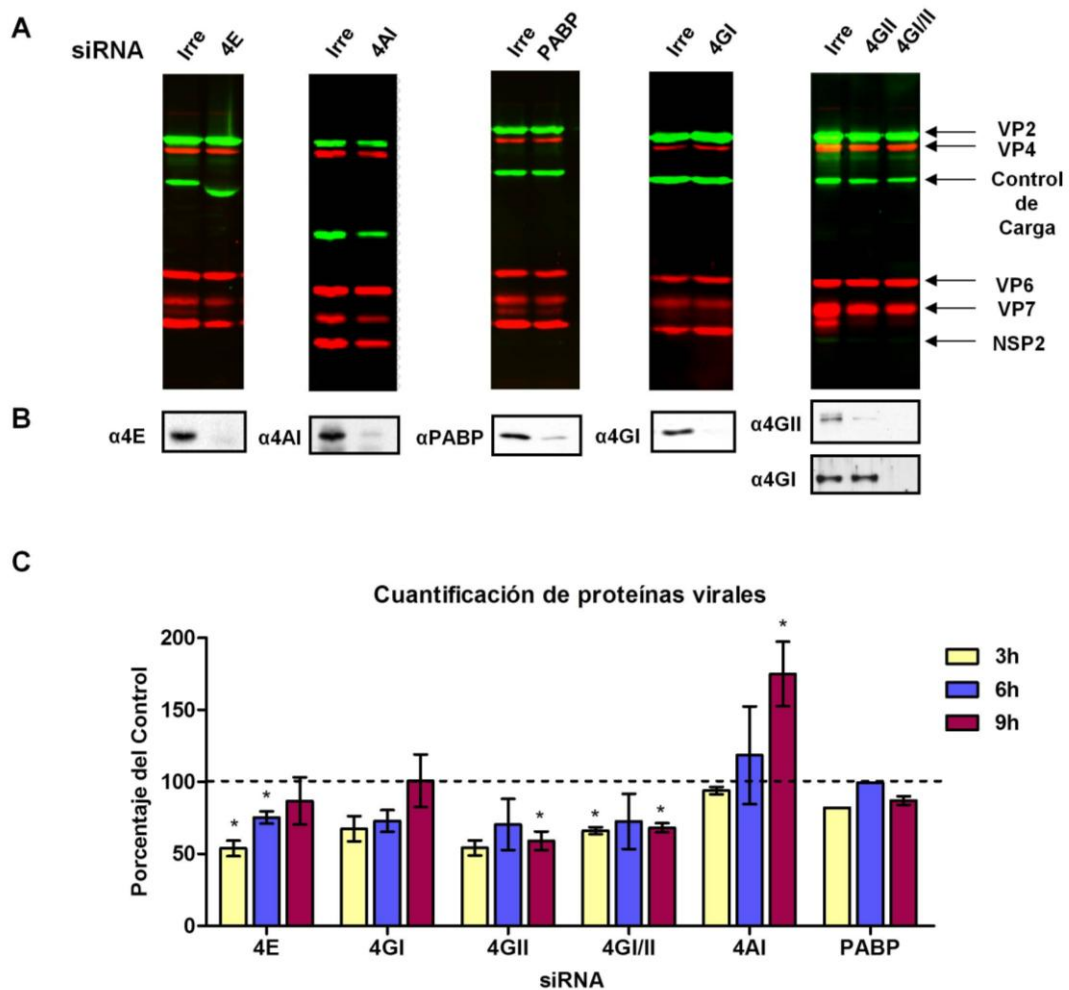
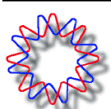


Figura 2.2. La disminución de la cantidad de eIF4GII en la célula afecta la síntesis de proteínas virales. Células MA104 fueron transfectadas con un siRNA irrelevante (Irre), siRNA^{eIF4E} (4E), siRNA^{eIF4AI} (4AI), siRNA^{PABP} (PABP), siRNA^{eIF4GI} (4GI), siRNA^{eIF4GII} (4GII), o una mezcla de los dos anteriores (4GI/II) y 72 h postransfección fueron infectadas. A las 2.5, 5.5 o 8.5 hpi las células fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S] por 30 min, para después ser cosechadas. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 10 % y se realizó la inmunodetección de VP2, VP4, VP6, VP7 y NSP2 (A) se muestra las inmunodetecciones a 9 hpi, con hsp70 como control de carga. (B) Inmunodetección de eIF4E, eIF4AI, PABP, eIF4GI y eIF4GII. (C) Se cuantificaron las proteínas virales de cada una de las inmunodetecciones por densitometría. El 100 % está referido a la cantidad proteínas virales producidas en células control transfectadas con el siRNA irrelevante a los diferentes tiempos. La gráfica muestra el promedio de al menos dos experimentos y la desviación estándar entre ellos. * $P < 0.05$.

Por otro lado observamos que el silenciamiento de la expresión de eIF4AI y de PABP no tuvo efecto sobre la producción de proteínas virales a ningún tiempo durante la infección (Figura 2.2A, 2.2B y 2.2C). Este resultado era esperado sobre todo para PABP ya que, como mencionamos anteriormente, los mRNAs virales no contienen cola poliA, y además se ha visto que durante la infección PABP se transloca al núcleo por lo que no se encuentra disponible para participar en la traducción.



A 9 hpi la baja expresión de la proteína eIF4GI no afecta la traducción de los mRNAs virales, sin embargo, de manera interesante, cuando se silencia la expresión de su homólogo, eIF4GII, la síntesis de proteínas virales disminuye (Figura 2.2A y 2.2C). Esto sugiere que en la infección se utiliza diferencialmente a eIF4GII y que su papel es importante en la traducción de los mRNAs virales y no puede ser sustituido por eIF4GI. Este resultado es interesante, dado que no se han reportado ejemplos de virus que utilicen de manera preferencial eIF4GII sobre eIF4GI para la traducción de sus mRNAs, aunque este hecho si se ha observado en la traducción de mRNAs celulares (2,3).

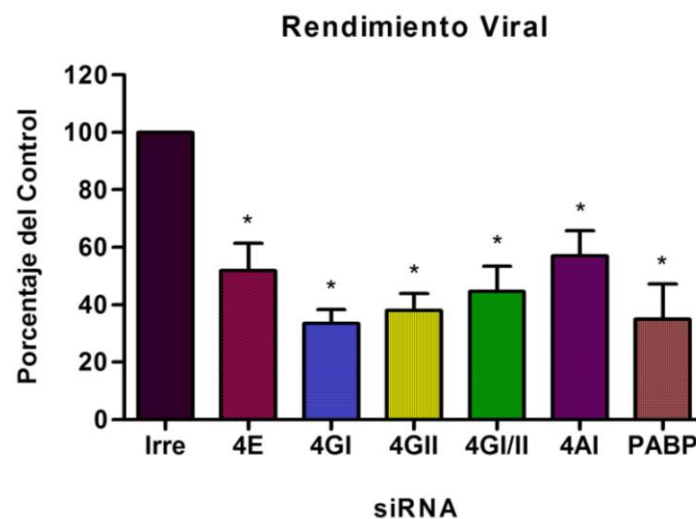
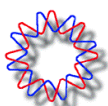


Figura 2.3. La inhibición de la expresión de los factores del complejo eIF4F y PABP afecta la producción de partículas virales infecciosas. Células MA104 fueron transfectadas con siRNA^{eIF4E} (4E), siRNA^{eIF4GI} (4GI), siRNA^{eIF4GII} (4GII), una mezcla de los dos anteriores (4GI/II), siRNA^{eIF4AI} (4AI), siRNA^{PABP} (PABP) o un siRNA irrelevante (Irre) y 72 hpt fueron infectadas con RRV con una MOI de 5; 14 hpi las células se cosecharon para determinar el título viral. El 100 % de rendimiento viral está referido al encontrado en células control transfectadas con el siRNA irrelevante. Se muestra el promedio de tres experimentos y la desviación estándar entre ellos. * $P < 0.05$.

Como parte de la caracterización del papel de las proteínas del complejo eIF4F en la infección por rotavirus se decidió examinar su importancia sobre la producción de progenie viral. Para esto se silenció la expresión de los factores eIF4E, eIF4GI y eIF4GII, eIF4AI y PABP, las células transfectadas se infectaron, a 14 hpi se cosecharon y se midió la cantidad de virus producido en cada condición. Se observó una reducción de entre 40 y 60 % en el título viral relacionado con la disminución de la síntesis de eIF4E, eIF4GII, eIF4AI y PABP, siendo la interferencia de la expresión de eIF4GI la que afectó más la producción de partículas virales infecciosas, reduciéndolas en un 65 % con respecto al control (Figura 2.3). En el caso de la interferencia de la expresión de eIF4GII la disminución en el rendimiento viral es consistente con la disminución de la síntesis de



proteína viral observada bajo estas condiciones, sin embargo, los resultados obtenidos con los demás factores (eIF4E, eIF4GI, eIF4AI y PABP) no muestran una relación directa entre la síntesis de proteína viral y la producción de virus infeccioso.

Dado que en condiciones donde se silenció la expresión de las proteínas del complejo eIF4F y PABP, el rendimiento de la progenie viral disminuyó, hecho que no coincide con la disminución en la síntesis de proteínas virales, a excepción de eIF4GII, se decidió examinar si la síntesis del mRNA y del dsRNA viral se veían afectadas en la ausencia o en bajas cantidades de estas proteínas. Con este fin se determinó mediante un ensayo de qRT-PCR la cantidad de mRNA y dsRNA viral producida a distintos tiempos en células transfectadas con siRNA dirigidos contra estas proteínas o con un siRNA irrelevante.

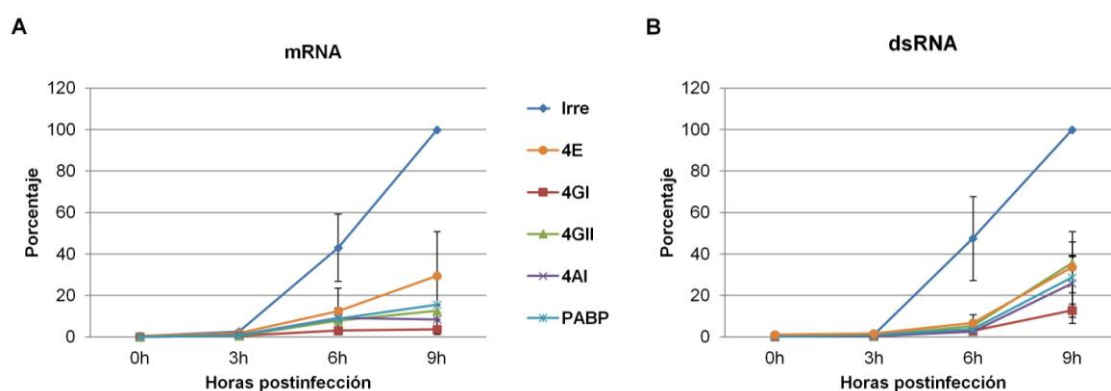
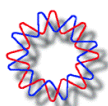


Figura 2.4. La síntesis de dsRNA y mRNA viral disminuye en células donde se inhibe la expresión de las proteínas del complejo eIF4F y PABP. Células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados fueron infectadas con RRV y a los tiempos indicados las células fueron cosechadas y el RNA fue extraído con Trizol. La cantidad de RNA de polaridad positiva y negativa, fue cuantificada por qRT-PCR. Se determinó la cantidad relativa de A) mRNA y B) dsRNA del gen 10 viral. Los valores se muestran como porcentaje con respecto a la cantidad del control determinada a nueve horas postinfección. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar entre ellos.

Encontramos que la cantidad relativa de mRNA, así como de dsRNA viral fue menor en las células en las que se silenció la expresión de eIF4E, eIF4GI, eIF4GII, eIF4AI y PABP con respecto a células transfectadas con un siRNA irrelevante (Figura 2.4A y 2.4B). A 9 hpi podemos observar que tanto la cantidad de mRNA como de dsRNA viral se reduce hasta aproximadamente un 85 y 90 %, en las células transfectadas con siRNAs dirigidos contra las proteínas del complejo eIF4F y PABP. Estos datos sugieren que la replicación viral es afectada por la disminución de las proteínas del complejo eIF4F y por PABP, ya sea porque estas proteínas estén implicadas directa o indirectamente en este proceso, o tal vez porque estén involucradas en aumentar la estabilidad de los transcritos virales.



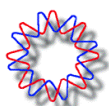
La relocalización de PABP no depende de su interacción con eIF4G

La interacción directa de NSP3 con eIF4G y el consiguiente desplazamiento de PABP, se ha propuesto como una de las causas de la relocalización de PABP hacia el núcleo de células infectadas (91). Esta idea sugeriría que la unión de PABP con eIF4G podría servir para anclar a la PABP en el citoplasma y si esta interacción es interrumpida, la PABP se liberaría y se relocalizaría al núcleo. Para explorar esta posibilidad, decidimos interferir la expresión de las dos isoformas de eIF4G (eIF4GI y eIF4GII) para evitar su interacción con PABP y determinamos la localización subcelular de PABP bajo estas condiciones.

En la Figura 2.5 podemos observar que en las condiciones control (siRNA irrelevante) la localización de PABP es principalmente citoplásmica. Asimismo, cuando se silenció la expresión de eIF4GI, de eIF4GII, o de ambas, se observó un patrón de distribución de PABP muy semejante (Figura 2.5), sugiriendo que la localización citoplásmica de PABP no depende de su interacción con eIF4G. Este resultado también nos permite concluir que durante la infección, el desplazamiento de PABP de su unión con eIF4G por NSP3 no debe ser suficiente para que PABP se relocalice al núcleo.

La proteína viral VP2 se encuentra en complejos proteicos asociados al cap

Como ya hemos mencionado, durante la infección por rotavirus, PABP es desplazada del complejo eIF4F, sin embargo, no se ha estudiado si el virus interfiere de alguna otra manera con la función de este complejo. Con el fin de estudiar la funcionalidad del complejo eIF4F durante la infección por rotavirus, se realizó una cromatografía de afinidad con 7-metil-GTP sefarosa que es un análogo del cap. Para esto, lisados de células MA104 infectadas o no con rotavirus y marcados radioactivamente con [³⁵S] fueron incubados con sefarosa 4B (resina 4B) para preaclazarlos y posteriormente se incubaron con 7-metil-GTP (cap) sefarosa, (resina cap). Las proteínas que se unieron a la resina se analizaron en geles de SDS-PAGE. Encontramos que el patrón de proteínas presentes en complejos con afinidad al cap es distinto entre células infectadas y no infectadas (Figura 2.6A), lo que sugiere que procesos que involucran la unión de proteínas al cap, como es el inicio de la traducción, pudieran ser distintos durante la infección por rotavirus.



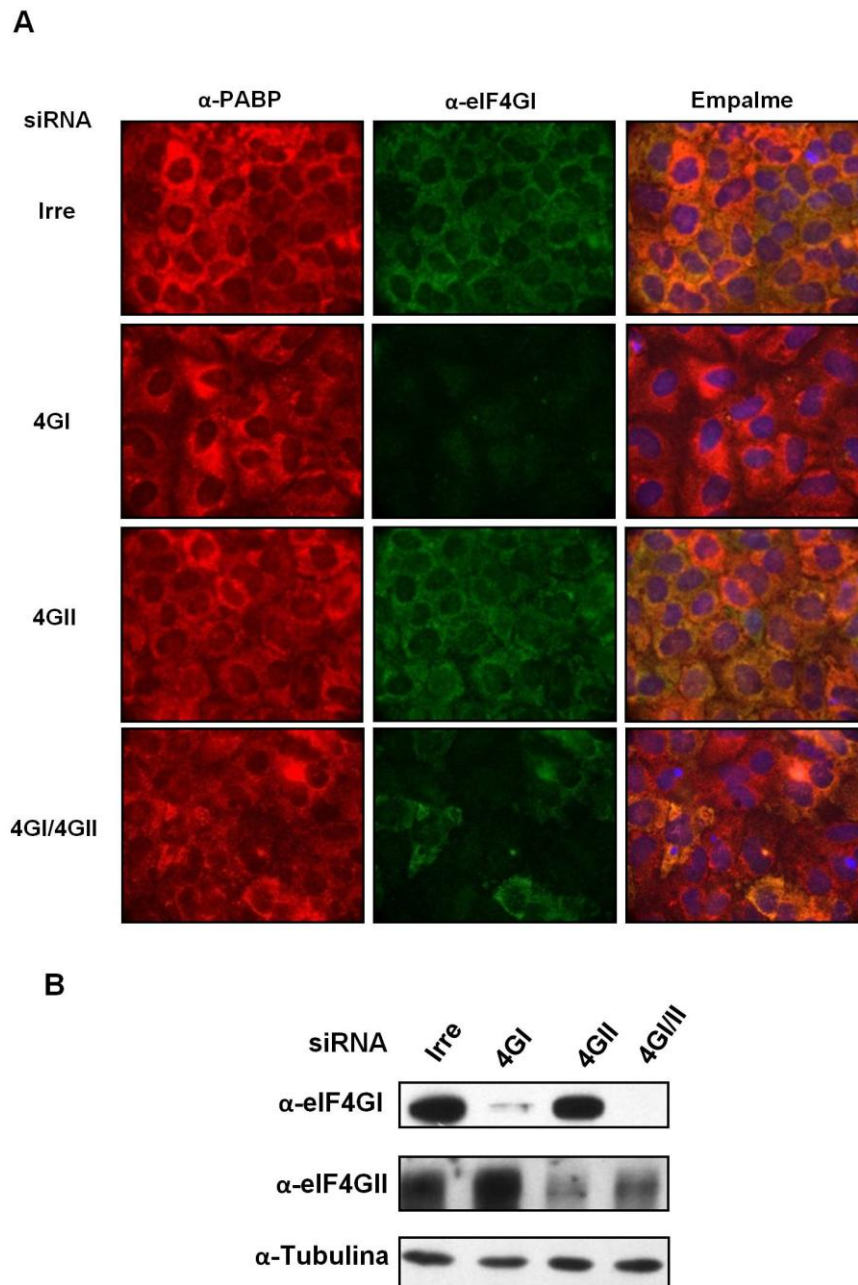
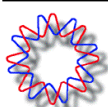


Figura 2.5. Distribución de PABP en células donde se interfiere la expresión de los factores eIF4GI y eIF4GII. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados. A) 72 hpt las células fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia. PABP fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PABP (PABP), mientras que eIF4GI fue detectado con un anticuerpo policlonal (eIF4GI), seguidos de una incubación con anti-ratón Alexa 568 y anti-conejo Alexa 488, respectivamente. El tercer panel muestra el empalme más la tinción con DAPI para ver núcleos. B) En pozos paralelos, las células fueron transfectadas con los siRNAs indicados como en (A), y 48 hpt las células se lisaron y las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE al 7 % e inmunodetectadas con los anticuerpos indicados.

Uno de los complejos proteicos con afinidad al cap más caracterizados es el complejo eIF4F. Para analizar si se encuentra presente en células infectadas y no



infectadas, realizamos ensayos de inmunodetección de cada uno de sus componentes (Figura 2.6B).

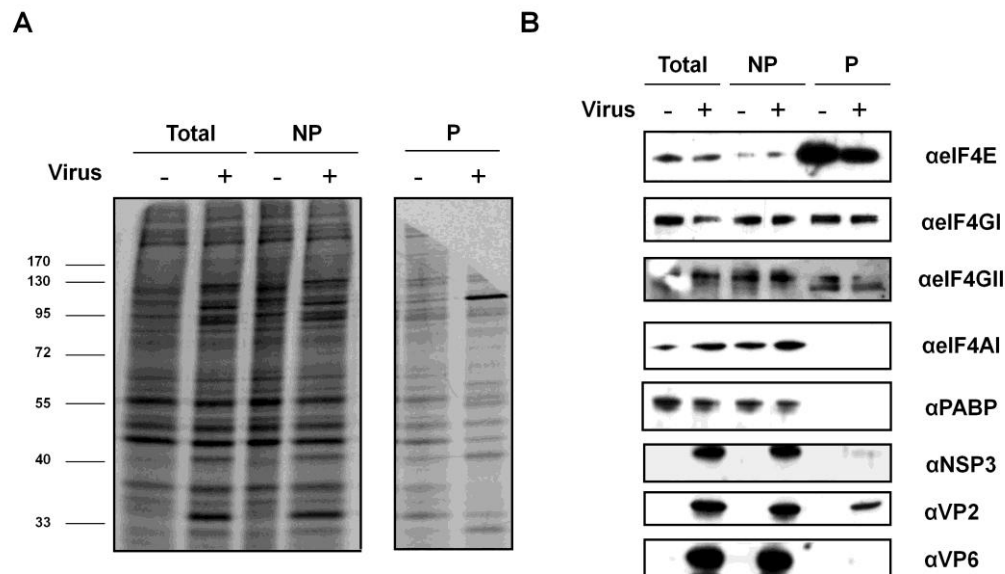
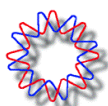


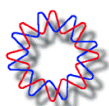
Figura 2.6. VP2 se encuentra en complejos que se unen al cap. Células MA104 fueron infectadas con RRV (+) o no (-) con una MOI de 5. De 0 a 6 hpi las células se marcaron metabólicamente con [35 S] e inmediatamente después fueron cosechadas. Se prepararon extractos solubles los cuales fueron preclareados con sefarosa 4B y posteriormente se incubaron con 7-metil-GTP sefarosa. Las proteínas unidas a la 7-metil-GTP sefarosa fueron eluidas con una solución 100 mM de 7-metil-GTP. A) Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y detectadas por autorradiografía. B) Inmunodetección de las proteínas indicadas. (Total) Lisado celular antes de ser incubado con la resina; (NP) proteínas que no se unieron a la resina; (P) fracción que contiene las proteínas eluidas de la resina con cap.

La proteína de unión al cap, eIF4E así como eIF4GI y eIF4GII, que se encuentran directamente asociadas a este factor, no muestran diferencias entre ambas condiciones. Las proteínas PABP y eIF4AI no se detectaron asociadas al cap en ninguna condición, lo cual podría ser debido a que solo una pequeña fracción de estas proteínas se encuentra en estos complejos y podría estar debajo del límite de detección del anticuerpo. Por otra parte, encontramos a la proteína viral NSP3 (Figura 2.6B), en complejos unidos al cap en células infectadas, lo cual era esperado, dado que durante la infección, NSP3 sustituye a PABP en su interacción con eIF4G. Con el fin de determinar si además de NSP3, alguna otra proteína viral se encuentra asociada a los complejos que se unen al cap, se analizó la presencia de proteínas virales por ensayos de inmunodetección. Sorprendentemente, encontramos que la proteína viral VP2 se encuentra asociada a la resina 7-metil-GTP, este



resultado es interesante ya que abre la posibilidad de que esta proteína viral tenga una participación en el proceso de traducción.

De los resultados anteriores surgieron varias preguntas, entre ellas si la presencia de VP2 en la fracción celular asociada al cap se debe a que se puede asociar de manera directa a esta estructura o tal vez sea a través de una interacción con alguna proteína que se una al cap, como eIF4E. Tratando de aclarar esto, decidimos analizar la asociación de VP2 con el cap en un contexto fuera de la infección. Con este fin, se produjo VP2 recombinante en la línea celular de insecto, sf9. Para esto, células sf9 fueron infectadas con un baculovirus recombinante que expresa VP2, 96 hpi, se cosecharon las células y los lisados se incubaron con la resina cap. En la Figura 2.7A observamos que la VP2 se expresa eficientemente en este sistema y también podemos ver que una pequeña cantidad de VP2 es capaz de asociarse a la resina con cap, aunque el pegado no es muy eficiente, dado que es apenas detectable. Esto podría deberse a que necesita asociarse a otras proteínas que pudieran no estar presentes en estas condiciones y que aumenten su afinidad hacia el cap. Como control de especificidad del pegado de VP2 a la resina, se decidió utilizar como control a la proteína viral VP6. Para ello, se expresó esta proteína en el sistema de baculovirus de manera similar que con VP2 y los lisados de las células sf9 expresando VP6 fueron incubados con la resina cap. VP6, al igual que VP2, se expresó de manera eficiente y también encontramos que una pequeña fracción estaba asociada a la resina cap (Figura 2.7B). Este resultado fue inesperado puesto que en los ensayos anteriores (Figura 2.6B) habíamos observado que la VP6 producida durante la infección no se asocia a la resina cap. Sin embargo, también observamos que la proteína VP6 se unió a la resina 4B con la que preaclaramos los lisados, por lo que tal vez la fracción de VP6 que observamos unida a la resina cap, está asociada a la matriz de la resina más que al cap en sí (Figura 2.7B). Otra posible explicación es que tal vez durante la infección, VP6 presenta características distintas a las de VP6 expresada con el sistema de baculovirus, que le impiden asociarse al cap.



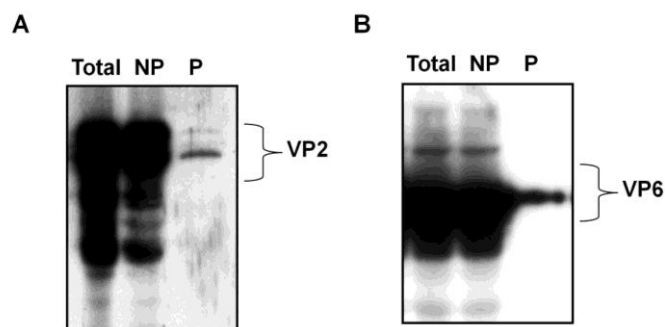
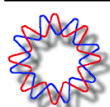


Figura 2.7. Unión de VP2 y VP6 recombinantes a la resina cap. Células sf9 fueron infectadas con un baculovirus recombinante que expresa la proteína VP2 (A) o VP6 (B) de rotavirus. Las células fueron cosechadas y los lisados fueron posteriormente incubados con 7-metil-GTP sefarosa (resina cap). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y después se realizó una inmunodetección de VP2 o VP6. (Total) Lisado celular antes de ser incubado con la resina; (NP) proteínas que no se unieron a la resina; (P) fracción que contiene las proteínas pegadas a la resina cap.

Hasta ahora hemos analizado el papel de las proteínas que forman parte del complejo eIF4F que son eIF4E, eIF4GI y su homólogo eIF4GII, eIF4AI y PABP en el ciclo replicativo de rotavirus. Lo que se observó es que al inhibir la expresión de estos factores de inicio de la traducción, la síntesis de proteínas celulares disminuye alrededor del 40 % lo que sugiere que si bien estas proteínas son importantes para el inicio de la traducción de los mRNAs celulares, no son indispensables. Sin embargo, existe la posibilidad que al no tener un silenciamiento completo de estos factores, la cantidad remanente sea suficiente para llevar a cabo este porcentaje de síntesis de proteínas celulares. Por otra parte se observó, de manera interesante, que la traducción de los mRNAs virales no requiere de los factores eIF4E, eIF4AI, PABP y que utiliza diferencialmente eIF4GII sobre eIF4GI y además, que estos factores de traducción pudieran tener una participación, directa o indirectamente, en la replicación y/o en la transcripción del genoma viral. Asimismo, se encontró que la proteína viral VP2 está presente en complejos proteicos asociados al cap, aunque no se determinó si esta asociación es directa o a través de otras proteínas. Este resultado es muy interesante y abre la posibilidad de una participación de proteínas virales en la traducción de los mRNAs de rotavirus.

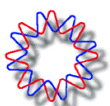
Efecto de las regiones no traducidas de los RNAs mensajeros virales en la eficiencia de traducción en células infectadas

En el control traduccional si bien son importantes los factores de traducción, es un hecho que otro factor determinante es el mRNA. Hay varios aspectos de un mRNA que



pueden afectar su traducción. La regulación transcripcional es un punto de control muy importante en la expresión de un gen, ya que un mensajero determinado al tener una mayor tasa de transcripción, será más abundante y aumentarán sus probabilidades de ser traducido. Además del cap en el extremo 5' y la cola poliA en el 3', la traducción de los mRNAs se puede ver afectada por secuencias que se encuentran alrededor del codón de inicio así como por potenciadores traducionales. Estos últimos se encuentran típicamente en las UTRs del mRNA pero también pueden estar en la región codificante. Los mRNAs de rotavirus se caracterizan por tener UTRs pequeñas lo cual teóricamente les confiere ventaja traducional al no tener una fuerte dependencia especialmente por el complejo de inicio de la traducción eIF4F. Esto es debido a que su UTR 5' al no ser muy grande no debería formar estructuras secundarias complejas, por tanto su requerimiento por la helicasa eIF4A debería ser bajo (5, 99).

Considerando la posibilidad de que los mRNAs virales tengan propiedades intrínsecas que les dan una ventaja traducional sobre los mRNAs celulares, decidimos estudiar algunas características de los mRNAs de rotavirus que pudieran favorecer su traducción durante la infección. Parte de los resultados de este trabajo que a continuación se describen se publicaron en el artículo “Rotavirus Prevents the Expression of Host Responses by Blocking the Nucleocytoplasmic Transport of Polyadenylated mRNAs” (Anexo). Como primer acercamiento decidimos analizar si las UTRs de los mRNAs virales jugaban un papel en su traducción preferencial durante la infección. Para esto se construyeron dos vectores que dirigen la síntesis de dos mRNAs quiméricos, cRc y vFv (Figura 2.8A) (construcciones realizadas por I. Mora). cRc contiene el marco de lectura abierta (ORF) que codifica para la proteína luciferasa de *Renilla* flanqueado por las UTRs del mRNA del gen que codifica para globina. Por su parte vFv tiene el ORF que codifica para la luciferasa de luciérnaga flanqueado por las UTRs derivadas del mRNA del gen 6 de rotavirus que codifica para la proteína estructural VP6 (Figura 2.8A). En estos ensayos, células MA104 fueron transfectadas con los mRNAs cRc y vFv (transcritos *in vitro*) antes o después de la infección con rotavirus y la traducción del mRNA de luciferasa, fue evaluada a las 8 horas postransfección en todos los casos. En la figura 2.8B se muestra el diseño del experimento. El tiempo cero está determinado por el momento de la transfección y los tiempos a los cuales se infectó se muestran de manera relativa a este punto. La traducción de los mRNAs fue determinada midiendo la actividad de cada tipo de luciferasa y normalizándolas con la cantidad del mRNA correspondiente, que fue



cuantificado por qRT-PCR. El nivel de traducción de los mRNAs cRc y vFv en células infectadas fue comparado con el de células sin infectar.

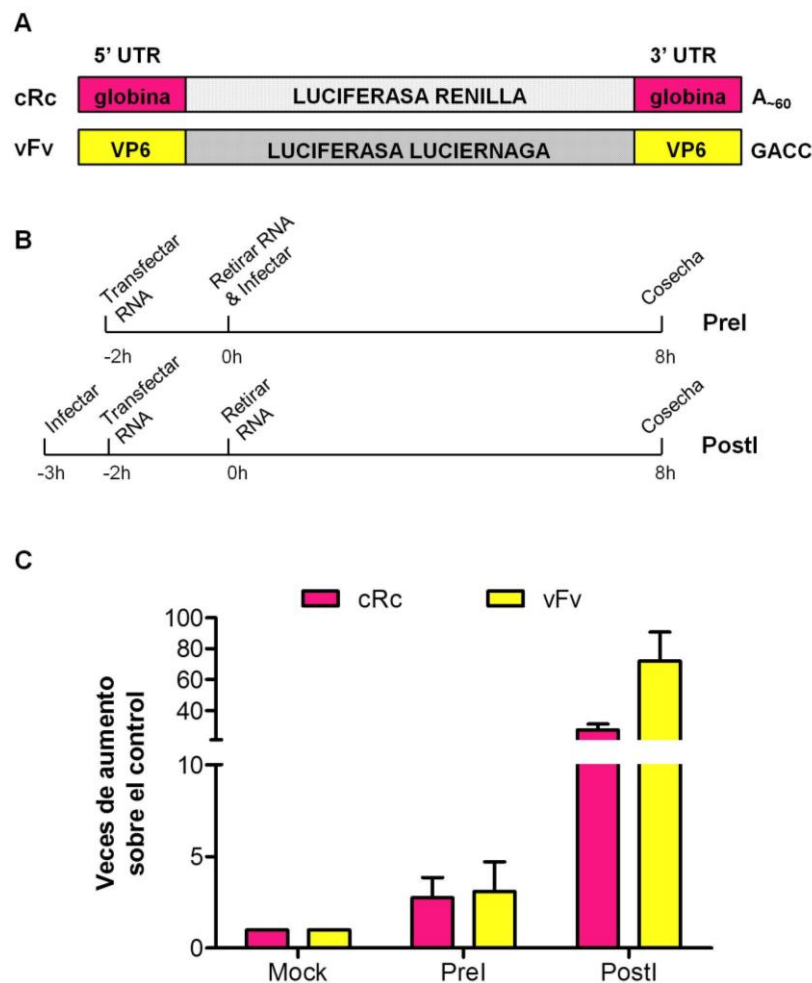
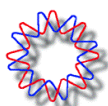


Figura 2.8. Las UTRs 5' y 3' no determinan la eficiencia de traducción de mRNAs reporteros en células infectadas. (A) Representación esquemática de los mRNAs reporteros cRc y vFv. cRc contiene el ORF que codifica para la proteína luciferasa de *Renilla* flanqueado por 19 y 25 nt derivados de los UTRs 5' y 3' respectivamente, del mRNA celular de globina. El mRNA contiene además una cola poliA, la cual fue introducida en el plásmido que se utilizó como templado para su transcripción. vFv contiene el ORF que codifica para la luciferasa de luciérnaga, flanqueado por 23 y 139 nt de los UTRs 5' y 3' respectivamente, del gen 6 de RRV, que codifica para la proteína VP6. (B) Diseño experimental para el análisis de la síntesis de luciferasa en células MA104 transfectadas a dos tiempos diferentes con respecto a la infección. cRc y vFv fueron transfectados en células MA104 sin infectar (Mock), 2 h antes de la infección con rotavirus RRV (PreI), o justo después del periodo de adsorción del virus (PostI). (C) Diez horas después de la transfección del RNA, las células fueron lisadas, y la actividad de cada luciferasa se midió y normalizó con la cantidad del mRNA transfectado correspondiente, el cual fue cuantificado por qRT-PCR en el mismo lisado. Las actividades están representadas como el porcentaje de la actividad normalizada obtenida cuando cada mRNA (cRc o vFv) fue transfectado en células sin infectar, el cual fue tomado como 1. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes y el error estándar entre ellos.

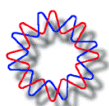
Observamos que cuando los mRNAs fueron transfectados antes de que la célula sea infectada, su nivel de traducción es muy similar. Para determinar si el tiempo en el cual los



mRNAs entran a la célula con respecto a la infección es importante para su traducción, células MA104 se transfectaron con cRc y vLv a dos tiempos diferentes con respecto a la infección (Figura 2.8B). De manera interesante cuando los mRNAs se transfectaron en células previamente infectadas, la traducción de ambos se incrementó considerablemente. Bajo estas condiciones la traducción del reportero vFv fue ligeramente mejor que la del reportero cRc (Figura 2.8C). Estos datos sugieren que las UTRs de los mRNAs de rotavirus no son las responsables de la traducción preferencial de los mRNAs virales sobre los mRNAs celulares y también sugiere que una vez que las células han sido infectadas hay un cambio en la maquinaria de traducción que la vuelve más eficiente, independientemente del mRNA que se esté traduciendo. Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad que dentro de la región codificante, existan secuencias que estimulen la traducción de los mRNAs virales de manera preferencial.

Localización de los mRNAs poliadenilados en células infectadas

Los datos anteriores indicaron que existe un aumento en la traducción de un mRNA poliadenilado transfectado en células infectadas por rotavirus. Entonces, si la traducción de los mRNAs poliadenilados no está bloqueada durante la infección, sino por el contrario, se encuentra aumentada, ¿por qué hay una disminución en la producción de proteínas celulares? Una posibilidad es que durante la infección se bloquee algún otro paso en la vía de la expresión génica, tal como el transporte de mRNAs de núcleo a citoplasma, lo cual provocaría una disminución de los mRNAs en el citoplasma como consecuencia de su acumulación en el núcleo. Para determinar si hay un cambio en la localización de los mRNAs poliadenilados durante la infección, las células MA104 fueron infectadas o no con RRV y a las 8 hpi se fijaron e hibridaron con una sonda complementaria a la cola poliA, (oligo-dT) la cual estaba marcada con biotina. Al mismo tiempo las células se inmunotñieron con anticuerpos dirigidos contra la proteína viral NSP3 para verificar la infección (experimento realizado por C. Ayala). En la Figura 2.9, panel superior, podemos observar que los mRNAs poliadenilados se encuentran distribuidos homogéneamente entre el núcleo y el citoplasma en células no infectadas. Sin embargo, en las células infectadas, la cantidad de mRNAs con cola poliA en el citoplasma disminuyó, pero no en el núcleo (panel medio).



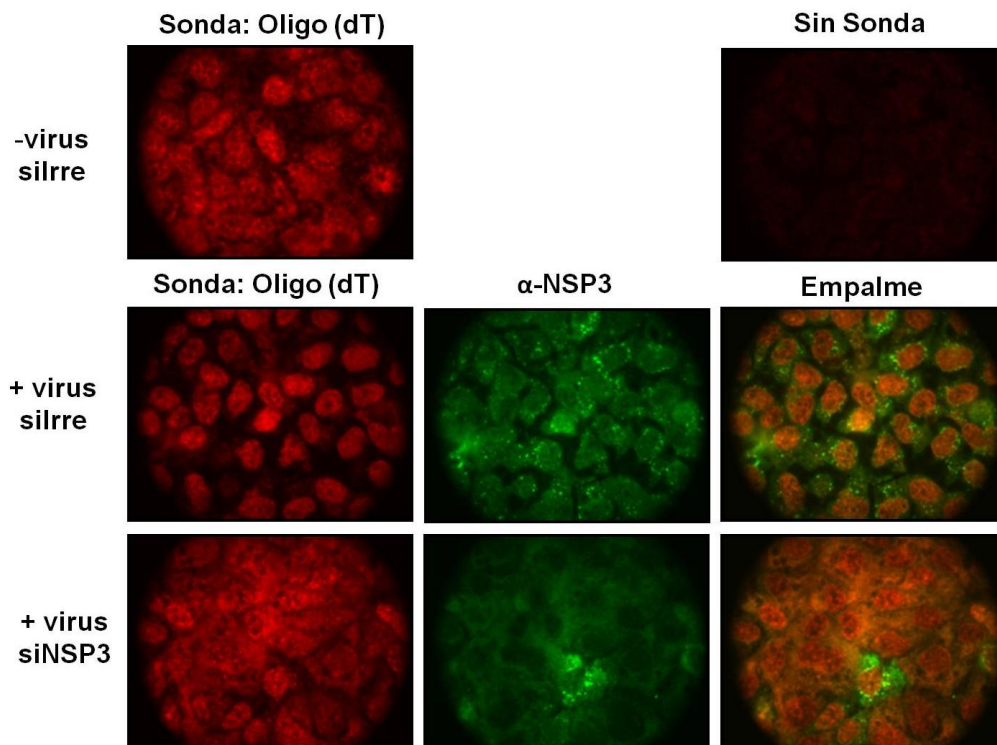
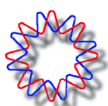


Figura 2.9. Los mRNAs poliadenilados se acumulan en el núcleo de células infectadas. Células MA104 crecidas en cubreobjetos fueron transfectadas con un siRNA dirigido contra NSP3 (siNSP3) o contra una secuencia irrelevante como control; 48 hpt las células fueron infectadas (+Virus) o no (-Virus) y 9 hpi las células se fijaron, permeabilizaron e hibridaron con una sonda de RNA marcada con Biotina. La proteína viral NSP3 o la sonda marcada fueron detectadas usando los anticuerpos correspondientes y los anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo.

Anteriormente en nuestro laboratorio se había demostrado que durante la infección por rotavirus hay una relocalización de la PABP, del citoplasma al núcleo, y que la responsable de esta relocalización es la proteína viral NSP3, ya que al silenciar su expresión durante la infección, la PABP se mantenía en el citoplasma (92). Para determinar si NSP3 está involucrada en la disminución de los mRNAs poliadenilados en el citoplasma de células infectadas, decidimos silenciar la expresión de esta proteína viral para después analizar la localización de los mRNAs celulares. En la Figura 2.9 observamos que cuando se silenció la expresión de NSP3, los mRNAs con cola poliA permanecen en el citoplasma de las células, a pesar de estar infectadas. Estos datos sugieren que durante la infección podría haber un bloqueo en el exporte de mRNAs celulares del núcleo al citoplasma dependiente de la proteína viral NSP3, lo que resulta en una disminución en la cantidad de estos mRNAs en el citoplasma.



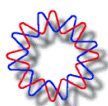
La expresión de un gen reportero en células infectadas depende de su localización subcelular

Para determinar si un bloqueo en el transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma, es una de las razones por las cuales se disminuye la producción de proteínas celulares durante la infección, decidimos evaluar la expresión del reportero luciferasa al introducirlo a la célula por dos vías distintas. En la primera se transfectó un plásmido que codifica para luciferasa de *Gaussia*. El plásmido tiene que llegar al núcleo, para ser transcrito y posteriormente el mRNA debe ser exportado al citoplasma para ser traducido. Por otra parte, se transfectó directamente el mRNA de la luciferasa de *Gaussia* (transcrito *in vitro* a partir del mismo plásmido que se transfectó), y al que se le adicionó o no cola poliA. Para descartar que diferencias observadas en la actividad del reportero pudiesen ser debidas a diferencias en las cantidades del mRNA correspondiente (transcrito en la célula o transfectado directamente), se cuantificó la cantidad de mRNA presente en cada condición por qRT-PCR y la actividad de luciferasa se normalizó a la cantidad de mRNA presente en cada condición.

En la Figura 2.10A se observa que la actividad del reportero que es expresado por medio de un plásmido, se inhibe en células infectadas alrededor de un 80 % en comparación con su expresión en células no infectadas. En contraste, cuando el reportero se expresa a partir de la transfección del mRNA transcrito *in vitro*, la actividad aumenta aproximadamente 3.5 veces en las células infectadas (Figura 2.10B); de manera interesante los mRNAs que fueron poliadenilados *in vitro* se tradujeron más eficientemente que los mRNAs que no contienen cola poliA.

Dado que la proteína viral NSP3 es la responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, estudiamos si esta proteína es también responsable de la disminución en la expresión de luciferasa por medio de un plásmido. Con este fin, analizamos la expresión de luciferasa en células en las que se interfirió la expresión de NSP3 mediante RNAi. Los resultados muestran que en condiciones donde se silenció la expresión de NSP3, la traducción de luciferasa a partir del plásmido ya no está disminuida en células infectadas, y la expresión del reportero a partir de la transfección de los mRNAs transcritos *in vitro* no se vio afectada (Figura 2.10A y B).

Estos resultados sugieren que en células infectadas, la traducción de los mRNAs poliadenilados, como tal, no se encuentra inhibida. En cambio la inhibición en la síntesis de proteínas podría deberse a un bloqueo en el exporte de mRNAs del núcleo al citoplasma.



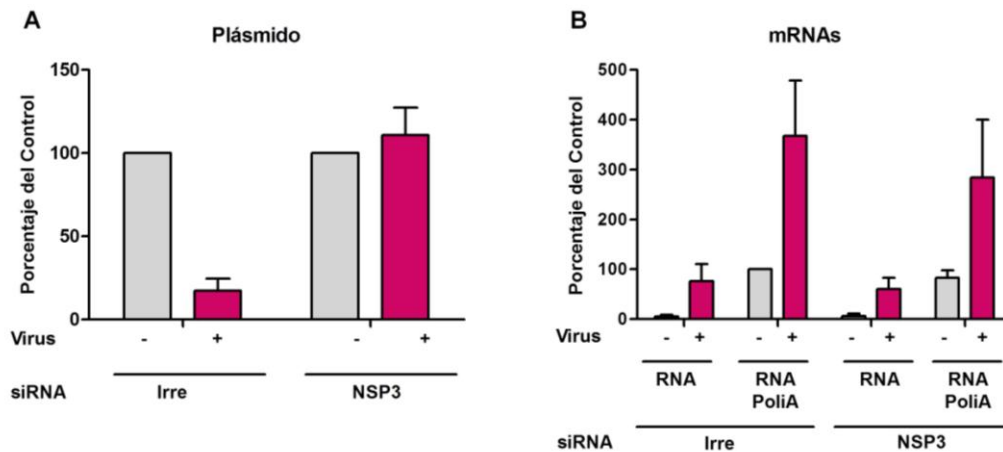
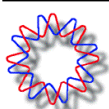


Figura 2.10. La traducción de los mRNAs transcritos en el núcleo es inhibida durante la infección por rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con un siRNA dirigido contra NSP3, o contra una secuencia irrelevante (Irre), e infectadas o no con RRV a una MOI de 5. Inmediatamente después de infectar las células, se transfectaron con el plásmido pTK-GLuc (A) o con mRNAs transcritos *in vitro* a partir del mismo plásmido (B) que codifica para la luciferasa de *Gaussia*. Doce hpi las células fueron cosechadas y la actividad de luciferasa fue medida y normalizada con la cantidad mRNA de luciferasa de *Gaussia* presente en cada condición, (determinado por qRT-PCR). En (A) las actividades están expresadas como porcentaje con respecto a la actividad de luciferasa obtenida en células no infectadas, que se tomó como 100 %; en (B) las actividades están relacionadas a la actividad obtenida para el mRNA poliadenilado en células no infectadas, transfectadas con el siRNA irrelevante. Se muestra el promedio de tres experimentos y el error estándar entre ellos.

La infección por rotavirus cambia la distribución subcelular de algunos mRNAs celulares

Para determinar si los mRNAs celulares también cambian su distribución subcelular durante la infección, decidimos estudiar la localización del mRNA de grp78, cuya transcripción aumenta en células infectadas, el mRNA de grp94 que no aumenta y el mRNA de GAPDH como control. Con este fin, células MA104 fueron infectadas o no y a distintos tiempos post-infección fueron cosechadas separando las fracciones nuclear y citoplásmica. Los mRNAs de cada gen fueron cuantificados por qRT-PCR en cada fracción. En la Figura 2.11 podemos observar que en células no infectadas, los mRNAs de grp78, grp94 y GAPDH se localizan principalmente en la fracción citoplásmica; a medida que transcurre la infección observamos que la cantidad del mRNA de grp78 aumenta, pero ese aumento se localiza solamente en la fracción nuclear. Por otra parte, aunque no vemos un cambio en la cantidad total del mRNA de grp94, observamos que la fracción citoplásmica de este mRNA va disminuyendo conforme transcurre la infección, mientras que la cantidad de este mRNA en el núcleo va en aumento. Como consecuencia podemos ver que a 12 hpi los mRNAs tanto de grp78 como de grp94 se encuentran localizados principalmente en la fracción nuclear, comparado con las células sin infectar. En contraste,



el mRNA de GAPDH mantiene su localización principalmente citoplásmica durante toda la infección.

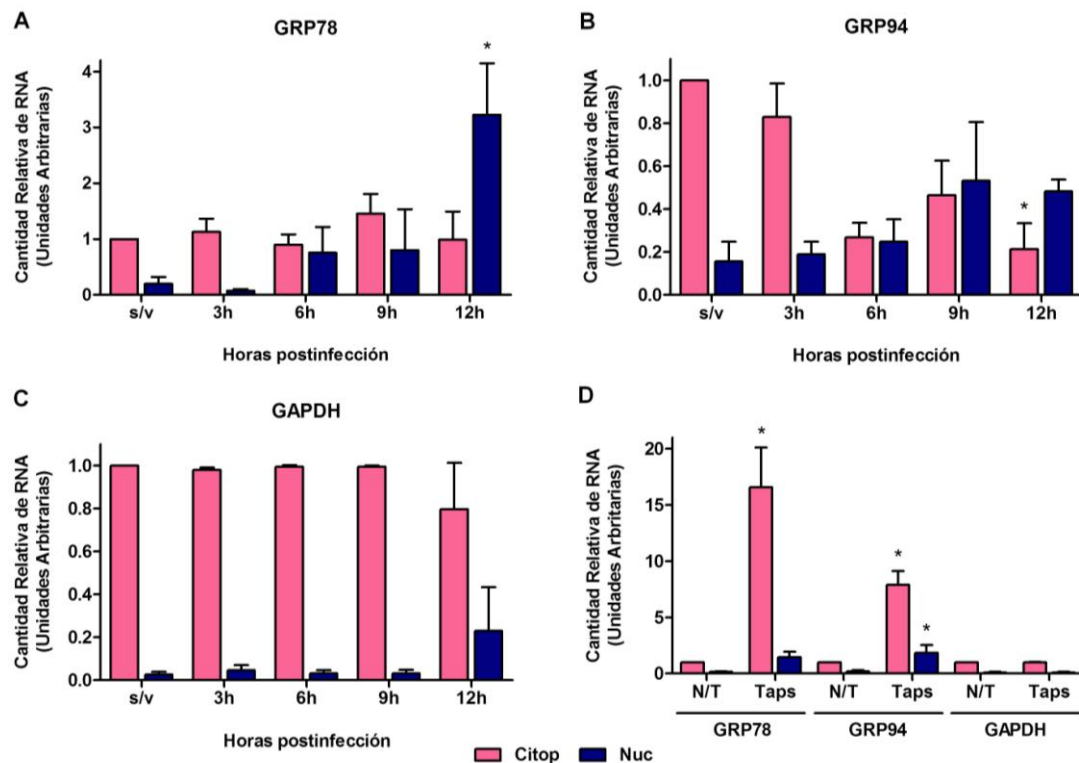
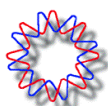


Figura 2.11. Distribución subcelular de los mRNAs celulares en células infectadas. Células MA104 fueron infectadas o no con rotavirus RRV, con una MOI de 5 y a los tiempos post-infección indicados (3, 6, 9 y 12 h) se cosecharon separando las fracciones citoplásmica (rosa) y nuclear (azul). El RNA de cada una de las fracciones se extrajo con Trizol y los mRNAs de GRP78 (A), GRP94 (B) y GAPDH (C) fueron cuantificados por qRT-PCR usando oligonucleótidos específicos. (D) Células MA104 fueron tratadas con 400 nM de tapsigargina (Taps) o no (N/T) y a 12 h post-tratamiento las células fueron cosechadas separando las fracciones citoplásmica y nuclear. La cantidad de los mRNAs de *grp78*, *grp94* y GAPDH fue determinada en cada fracción como en A, B y C. Los resultados están expresados como veces de aumento con respecto a la cantidad de cada mRNA (*grp78*, *grp94* o GAPDH) presente en la fracción citoplásmica de células no infectadas, la cual se tomó como 1. Se muestra el promedio de tres experimentos y el error estándar entre ellos. Los asteriscos representan diferencias significativas determinadas por ANOVA ($P < 0.05$) entre células tratadas y sus contrapartes sin tratamiento.

Para determinar si el cambio en la distribución de los mRNAs de *grp78* y *grp94* es un evento disparado por la infección por rotavirus y no una respuesta generalizada de la célula hacia un estrés, decidimos estudiar la localización de estos mRNAs en células tratadas con un inductor farmacológico de estrés de retículo endoplásmico, la tapsigargina (Taps). En la Figura 2.11D podemos ver que a pesar de que hay un gran incremento en la cantidad de los mRNAs de *grp78* y *grp94* causado por el tratamiento con Taps, estos mRNAs se acumulan principalmente en la fracción citoplásmica a diferencia de lo que se observa en las células infectadas. Estos resultados sugieren que durante la infección con



rotavirus la salida de los mRNAs del núcleo al citoplasma está bloqueada; de esta manera si durante la infección se transcriben nuevos mRNAs éstos se acumularán en el núcleo de la célula, como en el caso del mRNA de grp78, en donde observamos que a pesar de que su transcripción es inducida, los mRNAs que se están produciendo permanecen en el núcleo. También podemos concluir que este cambio en la localización de los mRNAs no es un evento generalizado provocado por estrés en la célula, sino que es inducido específicamente por la infección viral.

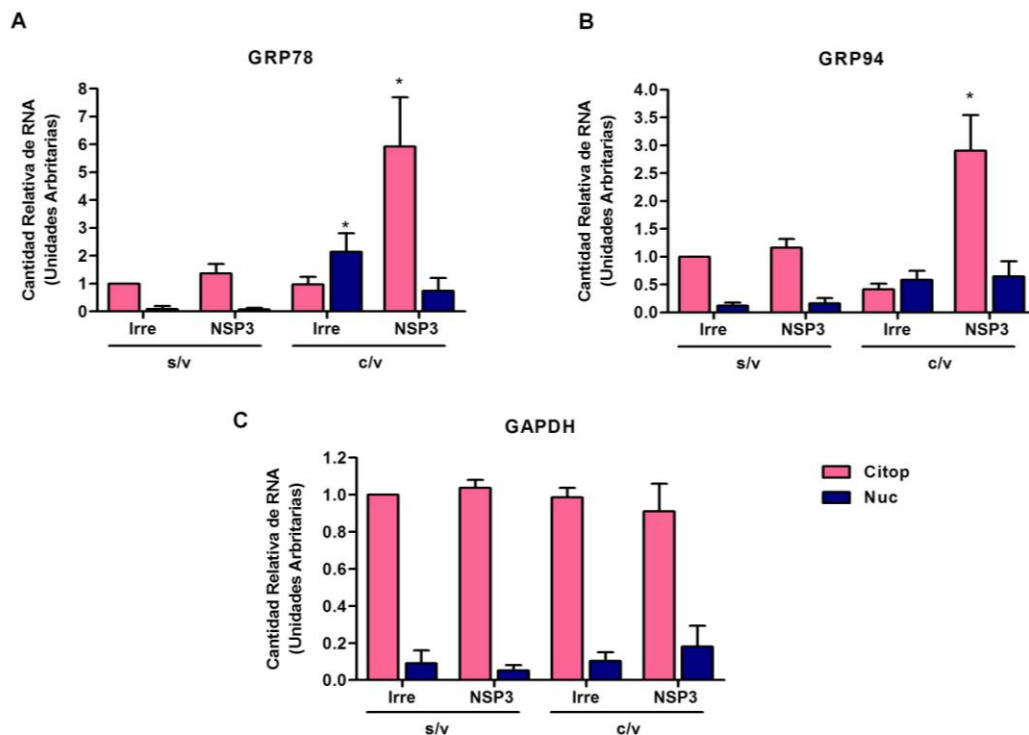
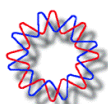


Figura 2.12. La proteína viral NSP3 es necesaria para el cambio en la distribución de los mRNAs celulares durante la infección. Células MA104 fueron transfectadas con el siRNA indicado y fueron infectadas (c/v) o no (s/v) con RRV a una MOI de 5. Doce hpi las células se cosecharon, separando las fracciones citoplásmica (rosa) y nuclear (azul), para posteriormente extraer el RNA con Trizol. Los mRNAs de grp78, grp94 y GAPDH fueron cuantificados en cada fracción por qRT-PCR. Los resultados están expresados como veces de aumento con respecto a la cantidad de cada mRNA (grp78, grp94 o GAPDH) presente en la fracción citoplásmica de células no infectadas, la cual se tomó como 1. Se muestra el promedio de tres experimentos y el error estándar entre ellos. Los asteriscos representan diferencias significativas determinadas por ANOVA ($P < 0.05$) entre células tratadas y sus contrapartes sin tratamiento.

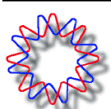
Para entender el mecanismo que opera durante la retención de los mRNAs celulares en el núcleo de las células infectadas por rotavirus, decidimos estudiar si alguna proteína viral participa en ello. Se ha descrito previamente que la proteína viral NSP3 es la responsable de la relocalización de la proteína PABP del citoplasma al núcleo durante la infección. Pensando que NSP3, pudiera estar involucrada en la inhibición de la exportación



de los mRNAs celulares, decidimos estudiar si la localización nuclear de los mRNAs de grp78 y grp94 durante la infección depende de la presencia de NSP3. En estos ensayos se transfectaron células con el siRNA de NSP3 y se determinó la distribución de los mRNAs mencionados. En la Figura 2.12 observamos que en ausencia de NSP3 hay una acumulación de los mRNAs de grp78 y grp94 pero a diferencia de lo que ocurre durante la infección, ésta aparece principalmente en la fracción citoplásmica. Estos resultados sugieren que la proteína viral NSP3 está directa o indirectamente relacionada con la retención de mRNAs celulares en el núcleo de células infectadas.

Durante la infección, se hiperadenilan los mRNAs celulares que se acumulan en el núcleo.

¿Cuál es el mecanismo por el cual NSP3 impide que los mRNAs celulares puedan ser exportados en células infectadas? Se sabe que la proteína celular PABP viaja entre el núcleo y el citoplasma de la célula, sin embargo su principal localización es citoplásmica. Se ha reportado que cuando este equilibrio se rompe y PABP se acumula en el núcleo, los mRNAs que se encuentran en el núcleo se hiperadenilan, es decir su cola poliA es más larga de lo normal, sin embargo el mecanismo responsable aún no se ha descrito. Esto a su vez provoca que el transporte núcleo-citoplasma de estos mRNAs sea inhibido (100). Para determinar si durante la infección los mRNAs celulares se encuentran hiperadenilados, se monitoreó el tamaño del mRNA de grp78 mediante Northern blot. En estos ensayos las células fueron infectadas o no con rotavirus y a las 12 hpi, el RNA total fue extraído y se hibridó con oligo-dT, después de la incubación, el RNA se trató con RNasa H y los productos fueron separados por electroforesis e hibridados con un oligonucleótido marcado con ^{32}P cuya secuencia es complementaria a una región del mRNA de grp78. En células infectadas con rotavirus se observó que el tamaño del mRNA de grp78 aumentó de manera heterogénea comparado con células no infectadas (Figura 2.13A). La diferencia en tamaño es resultado de una hiperadenilación ya que el tratamiento con RNasa H que degrada la cola poliA hibridada al oligo-dT, resultó en una migración similar de los mRNAs de grp78 provenientes de células sin infectar. Estos resultados sugieren que los mRNAs se hiperadenilan durante la infección, probablemente debido a la relocalización de PABP al núcleo, lo cual a su vez podría estar bloqueando su exportación al citoplasma.



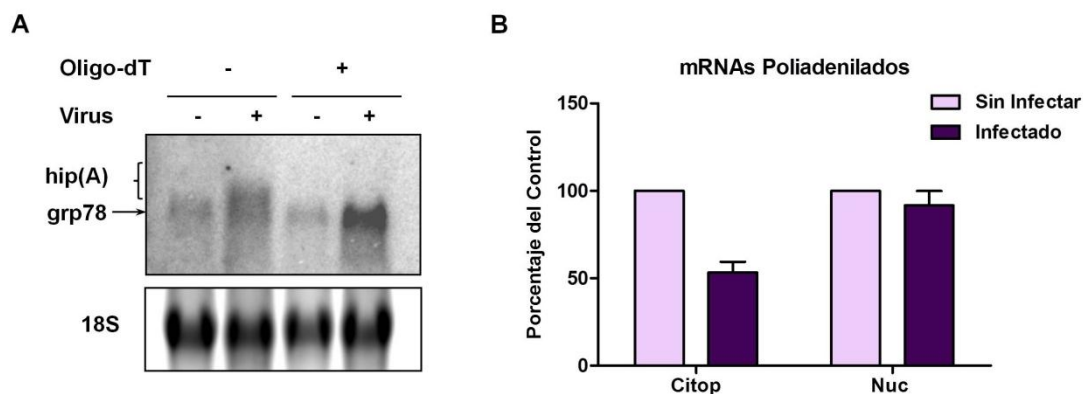
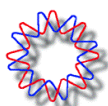


Figura 2.13. Los mRNAs celulares están hiperadenilados durante la infección por rotavirus. (A) Células MA104 fueron infectadas o no con RRV, y a 12 hpi las células fueron lisadas. El RNA se extrajo con Trizol, se hibridó, o no, con oligo-dT y posteriormente fue digerido con RNasa H. Los productos de este tratamiento se resolvieron en un gel de agarosa-formaldehído al 0.8 % y se hibridaron con un oligonucleótido para detectar grp78 marcado con ^{32}P . Los mRNAs hiperadenilados están indicados por el corchete [hip(A) grp78]. Se muestra el RNA ribosomal 18S como control de carga. (B) Células MA104 fueron infectadas o no con RRV y 12 hpi fueron cosechadas separando las fracciones citoplásmica y nuclear. El RNA total de cada una de las fracciones fue extraído por Trizol y posteriormente los mRNAs poliadenilados se purificaron por cromatografía de afinidad para ser cuantificados por espectrofotometría. Se muestra el promedio de tres experimentos y el error estándar entre ellos.

Cuantificación de mRNAs poliadenilados en células infectadas

Después de establecer que la salida de los mRNAs celulares está inhibida durante la infección por rotavirus, nos preguntamos, ¿qué pasa con los mRNAs poliadenilados ya existentes en el citoplasma? Para determinar si estaban siendo degradados, se infectaron o no células MA104 y fueron cosechadas a 12 hpi, separando las fracciones citoplásmica y nuclear. Se aislaron los mRNAs poliadenilados mediante una columna de oligo-dT y posteriormente se cuantificaron por espectrofotometría. Observamos que en el citoplasma de células infectadas hay una reducción de los mRNAs poliadenilados de aproximadamente 50 % comparado con el citoplasma de células sin infectar (Figura 2.13B). Por otra parte la cantidad de mRNAs poliadenilados en el núcleo no cambia. Estos datos sugieren que la disminución de la cantidad de mRNAs poliadenilados en el citoplasma de células infectadas podría deberse a la degradación que normalmente existe en las células, sin embargo, al estar inhibido el transporte núcleo-citoplasma de mRNAs, los que están siendo degradados en el citoplasma no se pueden restituir por nuevos mRNAs. Otra posibilidad es que durante la infección la degradación de los mRNAs aumente, ya sea porque el virus induzca algún mecanismo de degradación específico, o como una respuesta de la célula a la infección.



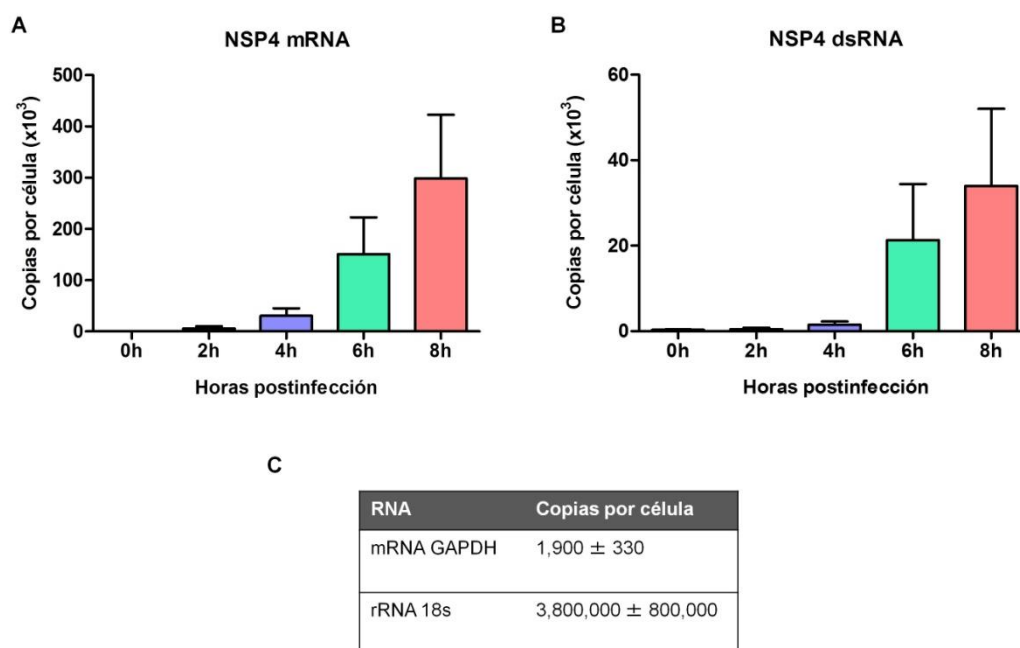
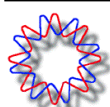


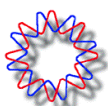
Figura 2.14. Cuantificación absoluta del mRNA y dsRNA del gen 10 de RRV. Células MA104 fueron infectadas con RRV a una MOI de 5. A los tiempos indicados, las células fueron cosechadas y el RNA fue extraído con Trizol. Las cantidades del mRNA (A) y dsRNA (B) del gen 10 de rotavirus (NSP4), así como del mRNA de GAPDH y del RNA ribosomal (rRNA) 18S (C) fueron cuantificadas por qRT-PCR. La cantidad de mRNA de NSP4 está expresado como copias por célula, la cual fue determinada basada en una curva de concentración realizada con cantidades conocidas del mRNA del gen 10 transcrito *in vitro*. Se muestra el promedio de tres experimentos y el error estándar entre ellos.

Cuantificación de los mRNAs virales durante la infección

Previamente se había cuantificado la cantidad del mRNA viral presente en las células infectadas, pero de manera relativa, es decir, sabemos cuantas veces se incrementa un gen viral durante la infección con respecto al tiempo, sin embargo no se había realizado una cuantificación exacta para saber la abundancia absoluta de los mRNAs virales y como se posicionan en relación a los mRNAs celulares. Con la finalidad de saber la cantidad de mRNA de rotavirus que hay durante la infección, se decidió utilizar PCR en tiempo real. Para esto se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones del mRNA del gen 10 transcrito *in vitro* y se confirmó que hubiera una relación lineal entre los valores de los ciclos de amplificación y el logaritmo de las concentraciones del mRNA. Con base en esta curva se determinó la concentración del RNA mensajero y doble cadena del gen 10 viral (NSP4) a distintos tiempos postinfección a una MOI de 5. Para normalizar la cantidad de RNA por muestra se utilizó un gen celular constitutivo, GAPDH. En una infección con una MOI de 5 la cantidad de copias por célula del mRNA de NSP4 va desde aproximadamente 100 a tiempo 0 hasta 300 000 a las 8 hpi (Figura 2.14A). También observamos que en



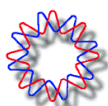
general la cantidad de dsRNA viral es 10 veces menor que la de mRNA y que la transcripción del genoma viral empieza antes que la replicación, ya que a las 2 hpi, mientras el mRNA ha aumentado al menos 10 veces su valor inicial, la cantidad de dsRNA difícilmente se ha duplicado, esto era esperado, ya que se sabe que la partícula viral al entrar a la célula comienza a transcribir, mientras que para replicar su genoma es necesario formar los complejos de replicación para lo que se requiere de la síntesis de proteínas virales (comparar Figura 2.14A con 2.14B). Al calcular el número de copias por célula del gen celular GAPDH encontramos que hay un promedio de 1900 mientras que encontramos hay aproximadamente 150 veces más del mRNA de NSP4 en una sola célula. En conjunto estos resultados nos indican que durante la infección la cantidad de mRNAs poliadenilados disminuye, mientras que los mRNAs virales son producidos en grandes cantidades, adquiriendo de esta manera una mayor probabilidad de ser traducidos.



DISCUSIÓN

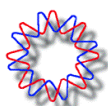
A pesar de las diversas funciones que los virus codifican para su replicación, en términos de producción de proteínas dependen completamente de la maquinaria de traducción celular. Los virus han evolucionado un número de mecanismos para modificar la maquinaria de traducción celular y apoderarse de ella. Al hacer esto muchas veces afectan la síntesis de proteínas celulares utilizando mecanismos que incluyen el corte proteolítico de factores de inicio de la traducción o la alteración del estado de fosforilación de algunos factores. Los dos puntos principales de regulación para el control del inicio de la traducción son la actividad de eIF2 y la formación del complejo eIF4F, y se ha mostrado que ambos son blancos para el control de la traducción por virus (36, 39, 72).

Los mRNAs de rotavirus tienen cap pero no están poliadenilados. Se sabe que la proteína viral NSP3 se une a la secuencia consenso que se encuentra en el extremo 3' no traducido de los mRNAs virales y además interacciona con eIF4GI con gran afinidad, desalojando a PABP de su interacción con este factor traduccional (28, 29, 33, 95). Debido a estas interacciones se propuso que NSP3 estimula el inicio de la traducción de los mRNAs virales y al mismo tiempo inhibe la traducción de los mRNAs celulares, especialmente de los mRNAs poliadenilados (32). Sin embargo, en nuestro laboratorio se demostró que NSP3 no es necesaria para la traducción eficiente de los mRNAs virales aunque sí es importante para la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (96). Para entender mejor el mecanismo utilizado por rotavirus para asegurar la traducción de sus mRNAs, decidimos examinar el papel de los factores de inicio de traducción que forman parte del complejo eIF4F y de PABP, en la síntesis de proteínas virales. Los resultados sugieren que sólo el factor eIF4GII, y no eIF4GI, parece ser importante para la traducción eficiente de los mRNAs virales. Este resultado es muy interesante ya que a pesar que los dos factores, eIF4GI y eIF4GII, presentan interacciones proteína-RNA y proteína-proteína similares (53, 101), cada isoforma podría tener un papel diferente en la traducción de los mRNAs de rotavirus. Se ha reportado anteriormente que ambas formas de eIF4G pueden ser reclutadas diferencialmente al cap durante el inicio de la diferenciación celular (51). Más recientemente, también se mostró que ambas isoformas de eIF4G pudieran estar participando en la traducción de diferentes grupos de mRNAs (102). Esto es importante dado que abre la posibilidad de la existencia de algún tipo de selectividad hacia las poblaciones de mRNA traducidos en células infectadas con rotavirus.



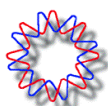
eIF4A es un factor de inicio de la traducción, que forma parte del complejo eIF4F, y un miembro prototipo de la familia de helicasas de RNA que contienen una caja DEAD. La actividad de eIF4A es estimulada por eIF4B y eIF4H (37, 40, 99, 103, 104). Esta helicasa es reclutada al extremo 5' de los mRNAs a través de su interacción con eIF4G y como resultado hay un incremento en la actividad de helicasa de eIF4A (105). Se ha demostrado que en condiciones donde hay una deficiencia de eIF4A/eIF4F, la traducción de los mRNAs que poseen estructura secundaria en su extremo 5' es inhibida preferencialmente (99). Sin embargo, se ha mostrado que los mRNAs que contienen poca estructura secundaria en el 5' UTR también requieren de eIF4A, éste es el caso de los mRNAs del virus del mosaico del tabaco (106). Además, la traducción de los mRNAs de dos miembros de la familia Caliciviridae; el calicivirus Felino (FCV) y el norovirus Murino I (MNV), muestran una dependencia diferencial por eIF4A que no es proporcional con la estructura secundaria del RNA en el extremo 5' de sus mRNAs (107). Nuestros resultados indican que en condiciones donde la expresión de eIF4A ha sido inhibida, la traducción de los mRNAs de rotavirus es estimulada. Dado que los mRNAs de rotavirus contienen UTRs cortas (5), esto podría influir en el bajo requerimiento de la actividad de eIF4A en el inicio de la traducción de estos mRNAs. Los resultados sugieren que la helicasa eIF4A inhibe la traducción de los mRNAs de rotavirus, aunque el mecanismo aún no es claro. Una posibilidad es que la traducción de los mRNAs con UTRs estructuradas, que aún se estén traduciendo durante la infección, disminuye debido a la reducción de la cantidad de eIF4A, y en consecuencia la maquinaria de traducción está más disponible para los mRNAs virales. Otra posibilidad es que el incremento en la síntesis de proteínas virales es un efecto indirecto del silenciamiento de eIF4A, es decir, al silenciar la expresión de esta proteína, se pudiera afectar la producción de alguna proteína celular que interfiere con la traducción de los mRNAs virales.

Se ha descrito que el silenciamiento de las proteínas virales VP2, VP6, NSP2 y NSP5 disminuye la traducción de los mRNAs virales (92, 97). Adicionalmente, Ayala-Breton *et al.* reportaron que al interferir la expresión de VP6, la cantidad de mRNA viral disminuye y proponen que bajo estas condiciones, la polimerasa viral VP1 se une a los mensajeros virales para formar intermediarios de replicación, volviéndolos inaccesibles para su traducción. Además describieron que al interferir la expresión de VP2, la vida media de los mRNAs virales se reduce aproximadamente un 50 % (97), lo que podría explicar la disminución en la producción de proteínas virales. En este trabajo se encontró que la proteína viral VP2 está presente en complejos proteicos asociados al cap, no así



VP6. Una posibilidad es que VP2 se una directamente al cap de los mRNAs virales, protegiéndolos de exonucleasas, lo que explicaría su papel en la estabilidad de estos mensajeros. También es probable que VP2 participe directamente en la traducción de los mRNAs virales, por ejemplo, al sustituir a algún factor de inicio de traducción celular; como en el caso de los hantavirus, en donde una proteína viral reemplaza la función del complejo eIF4F, promoviendo así la traducción de los mRNAs virales (108).

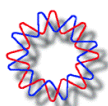
Se ha reportado la existencia de un potenciador de la traducción en el extremo 3' no traducido de los mRNAs de rotavirus, que consiste de la secuencia terminal 5'-UGACC-3'. Estos resultados se obtuvieron transfectando varios reporteros con el ORF de luciferasa de luciérnaga con diferentes segmentos del UTR 3' derivado del gen 6 de la cepa de rotavirus SA11 y utilizando como control de transfección un mRNA que codifica para luciferasa de *Renilla* (109). En contraste, en este trabajo se analizó si las UTRs de rotavirus proveen a los mRNAs una ventaja en traducción comparado con las UTRs de un mRNA celular, en células infectadas. Se determinaron las diferencias en la eficiencia traduccional de dos reporteros, uno con las UTRs derivadas del gen 6 de RRV y el otro con las UTRs derivadas del mRNA celular que codifica para globina, midiendo la actividad de los reporteros y normalizándola con la cantidad de cada mRNA. Los resultados indican que las UTRs de rotavirus no proporcionan una ventaja traduccional sobre las UTRs de un mRNA celular, ya que la traducción de un reportero "tipo viral" se incrementó de manera similar que la traducción de un reportero "tipo celular", en células infectadas. Estos resultados sugieren que los mRNAs de rotavirus se traducen preferencialmente sobre los mRNAs celulares a través de un mecanismo que pareciera ser independiente de secuencias en *cis* que pudieran estar presentes en sus UTRs. En cambio, se observó que si los mRNAs aparecen en el citoplasma de la célula después de que ha sido infectada, estos mRNAs se traducen preferencialmente. El incremento en la traducción de un reportero con las UTRs del mRNA celular que codifica para globina, aún del reportero con cola poliA, indica que este mRNA es resistente a la inhibición de la expresión inducida por rotavirus. Los mRNAs de rotavirus son sintetizados *de novo* en células infectadas, esto podría favorecer la traducción eficiente de los mRNAs virales sobre los mRNAs celulares. Este resultado indica que durante la infección por rotavirus, la traducción de los mRNAs poliadenilados no se encuentra inhibida como se sugirió anteriormente. Además, sugieren que una vez que la célula es infectada hay un cambio en la maquinaria de traducción o en los mRNAs que ya se encontraban en el citoplasma, de tal manera que la traducción es estimulada solamente para los mRNAs que se introducen a la célula después de la infección; otra posibilidad es



que sólo los mRNAs que se encontraban en el citoplasma son sensibles a la inhibición de la traducción inducida por rotavirus. Esto ha sido previamente reportado en células infectadas con VSV, donde se muestra una traducción preferencial de los mRNAs introducidos en el citoplasma después de la infección (110).

La regulación de la expresión génica se lleva a cabo a varios niveles que abarcan desde la transcripción del mRNA en el núcleo, su procesamiento, transporte al citoplasma y su traducción para sintetizar la proteína codificada. Los virus utilizan varias estrategias de regulación durante la traducción, pero también son capaces de regular pasos anteriores a ésta, incluyendo el transporte de los mRNAs celulares del núcleo al citoplasma. Por ejemplo, adenovirus y el virus de influenza inhiben selectivamente el transporte de los mRNAs celulares al citoplasma (111). Interesantemente, hay reportes de virus de RNA, poliovirus y VSV, que se replican por completo en el citoplasma, y que también inducen una inhibición del tráfico núcleo-citoplasma (112-116).

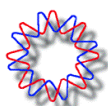
Nuestros resultados sugieren que durante la infección con rotavirus la regulación de la expresión génica celular podría llevarse a cabo en más de un nivel. Por una parte el desplazamiento de PABP de su unión a eIF4G y su secuestro en el núcleo inhiben la traducción de los mRNA celulares que contienen poliA, y a la vez el hecho de que durante la infección se bloquee el paso de mRNAs del núcleo al citoplasma resulta en un segundo nivel de control de la traducción celular. En conjunto los resultados muestran que durante la infección de rotavirus hay una acumulación de mRNAs poliadenilados en el núcleo, mientras hay una reducción en la cantidad de estos mRNAs en el citoplasma lo cual los vuelve no disponibles espacialmente para ser traducidos y la proteína viral NSP3 está directa o indirectamente involucrada. Hay varios mRNAs cuya transcripción es inducida en la infección por rotavirus, dentro de estos mRNAs se encuentran varios involucrados en la Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR por sus siglas en inglés) como lo son grp78, CHOP y GADD34 (117). Sin embargo, nuestros resultados indican que al menos el mRNA de grp78 cuya transcripción se induce, no llega al citoplasma y por lo tanto no es traducido, ya que a pesar de que se observa un incremento en la cantidad total de este mRNA, este aumento se observa principalmente en el núcleo. En concordancia con estos resultados se ha reportado que la UPR es controlada por NSP3 durante la infección por rotavirus (117). Interesantemente observamos que cuando la expresión de NSP3 ha sido inhibida, hay un aumento en la cantidad de los mRNAs de grp78 y grp94 y que este incremento se encuentra principalmente en el citoplasma. Esto sugiere que el control del UPR durante la



infección por rotavirus, podría darse, al menos parcialmente, limitando el exporte de mRNAs celulares responsivos que son traducidos durante esta respuesta celular.

Se ha mostrado previamente que durante la infección por rotavirus hay una relocalización de la proteína PABP hacia el núcleo (91, 92). Recientemente Glausinger reportó que cuando PABP se acumula en el núcleo se presenta una hiperadenilación y retención nuclear de los mRNAs celulares, inhibiendo de esta manera su expresión (100). Nuestros resultados muestran que en efecto durante la infección por rotavirus, los mRNAs se hiperadenilan y se retienen en el núcleo. Anteriormente se estableció que NSP3 es la responsable de la acumulación de PABP en el núcleo, y nuestros resultados muestran que también juega un papel en la retención de los mRNAs en el núcleo de células infectadas, lo cual podría ser un efecto indirecto debido a la relocalización de PABP. Dado que los mRNAs de rotavirus son transcritos en el citoplasma, inducir la hiperadenilación de los mRNAs y su consecuente retención en el núcleo, implica una vía efectiva para bloquear selectivamente la expresión génica de los mRNAs nacientes.

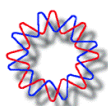
Varios virus tienen como blanco la proteína PABP; muchos de ellos codifican para proteasas que la cortan, como poliovirus, calicivirus, virus de hepatitis A, HIV-1 y HIV-2 (81). Además, otros virus la relocalizan, por ejemplo, el virus de vaccinia recluta a PABP a fábricas de replicación virales, donde ocurren la transcripción y la traducción (82). Sin embargo, al igual que rotavirus, las infecciones por herpesvirus y bunyavirus resultan en la acumulación de PABP en el núcleo (81, 87, 88). El mecanismo por el cual se retiene esta proteína en el núcleo en cada una de estas tres infecciones no ha sido establecido aún, aunque se sabe que las proteínas virales están implicadas en ello. En el caso de rotavirus, se sabe que la proteína viral NSP3 es requerida para que ocurra esta acumulación. Se ha sugerido que la interacción de PABP con eIF4G retiene a PABP en el citoplasma y como NSP3 desplaza a PABP de su unión con eIF4G, PABP libre puede relocalizarse al núcleo (91). En este trabajo se exploró la importancia de la interacción entre NSP3 y eIF4G en la relocalización de PABP. Los resultados sugieren que esta interacción (o la falta de ésta) no es suficiente para causar la acumulación de PABP en el núcleo, ya que cuando se silenció la expresión de ambas isoformas de eIF4G, eIF4GI y eIF4GII, PABP no sufrió ninguna relocalización. Recientemente se aisló y caracterizó una cepa derivada del rotavirus SA11-4F, que contiene una duplicación dentro del gen 7, que codifica para NSP3. En comparación a la proteína silvestre NSP3, la NSP3 mutante (NSP3m) muestra una baja capacidad para interactuar con eIF4G y para inhibir la síntesis de proteínas celulares. Además, NSP3m no es capaz de inducir la acumulación de PABP en el núcleo de células



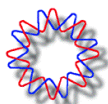
infectadas (118). Todo esto nos indica que la interacción de NSP3 con eIF4G es necesaria, pero no suficiente para que PABP se acumule en el núcleo.

PABP contiene 4 motivos de reconocimiento de RNA (RRM). Los dos primeros RRM de PABP, los cuales son necesarios para unirse a la cola poliA, también son requeridos para direccionar a PABP al núcleo (55, 56). Recientemente se ha reportado que estos RRM son utilizados para interactuar con importina α , un importante componente de la maquinaria de importe al núcleo, y que esta interacción está antagonizada por la presencia de mRNAs poliadenilados. Proponen que mientras PABP se encuentra unido a los mRNAs con cola poliA no es capaz de interactuar con importina α , y en consecuencia permanece en el citoplasma (119). Por otra parte, también se ha observado que además de liberarse de los mRNAs poliadenilados, PABP no debe estar presente en complejos de traducción para ser capaz de relocarse al núcleo (120). Anteriormente Harb, et al., mostraron que NSP3 por sí sola, es capaz de inducir la relocalización de PABP al núcleo, aún en células no infectadas. Para que esto suceda, es necesario que NSP3 interactúe tanto con eIF4G, como con RoXaN (91). Estas observaciones sugieren que NSP3 debe ser capaz de desplazar a PABP de complejos de traducción, mediante su interacción con eIF4G, como de liberarla de los mRNAs poliadenilados. Nuestros resultados muestran que durante la infección por rotavirus hay una reducción de mRNAs con poliA en el citoplasma de la célula infectada, lo que podría resultar en un incremento en la cantidad de PABP que no se encuentra unida a mRNAs poliadenilados y que ahora está disponible para interactuar con importina α y en consecuencia ser importada al núcleo. La infección con hespesvirus gama, beta y coronavirus alfa resultan en la acumulación de PABP en el núcleo, además de una degradación general de los mRNAs, iniciada por un factor viral (100, 121). Sería de gran interés estudiar si NSP3 como parte del mecanismo para relocalizar a PABP, es capaz de inducir la degradación de los mRNAs poliadenilados en células infectadas y si la proteína RoXaN tiene una participación en ello, dado que como mencionamos anteriormente, es necesario que además de unirse a eIF4G, NSP3 debe ser capaz de interactuar con RoXaN para direccionar a PABP al núcleo.

Nuestros resultados muestran que durante la infección por rotavirus, el proceso de traducción no está inhibido aún para mRNAs poliadenilados. La regulación de la expresión génica en células infectadas parece ser un proceso multifactorial. Primero hay una alteración en el programa de la maquinaria de traducción, de tal forma que después que la célula ha sido infectada, los nuevos mRNAs que son sintetizados se traducen preferencialmente. Por otra parte, la proteína viral NSP3 previene que los nuevos mRNAs

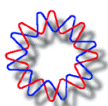


celulares que son transcritos en el núcleo alcancen el citoplasma, y de esta manera no se encuentren disponibles espacialmente para ser traducidos. Mientras tanto la población de los mRNAs celulares disminuye en el citoplasma durante la infección mientras los mRNAs virales se transcriben en el citoplasma a una tasa muy alta lo cual resulta en una cantidad enorme de transcritos virales nuevos, disponibles para ser traducidos.



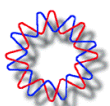
CONCLUSIONES

- eIF4E, eIF4AI y PABP no son necesarias para la síntesis de proteínas virales.
- eIF4GII, pero no eIF4GI, es necesario para la eficiente traducción de los mRNAs virales.
- Una disminución en la cantidad de las proteínas del complejo eIF4F y PABP, afecta la producción de de RNA mensajero y de RNA de doble cadena viral, lo que tiene como consecuencia una disminución de partículas virales infecciosas.
- VP2 se encuentra asociado en complejos de unión al cap.
- Las UTRs de los mRNAs virales no contienen señales que favorecen su traducción durante la infección.
- Los mRNAs que se introducen a la célula después de la infección, se traducen mejor que los que están presentes antes que la célula sea infectada.
- Durante la infección hay una inhibición en la salida de mRNAs de núcleo a citoplasma y NSP3 es necesaria para que esto se lleve a cabo.
- La inhibición en la expresión de genes celulares durante la infección parece ser debido a una inhibición en la exportación de los mRNAs más que a una inhibición en la traducción de mRNAs poliadenilados.
- La cantidad de mRNAs poliadenilados disminuye en el citoplasma de células infectadas mientras que los mRNAs de Rotavirus se producen en grandes cantidades.



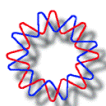
PERSPECTIVAS

- Determinar si la proteína viral VP2 está involucrada en la traducción de los mRNAs del virus.
- Estudiar por qué los mRNAs que entran a la célula después de la infección se traducen mejor que los que ya se encontraban ahí.
- Analizar qué mRNAs se encuentran en citoplasma y cuáles en núcleo y si esto correlaciona con su nivel de expresión durante la infección.
- Estudiar el mecanismo por el cual PABP se acumula en núcleo y el papel que NSP3 tiene en ello.
- Analizar si durante la infección los mRNAs son degradados activamente por una vía inducida por el virus.

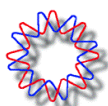


REFERENCIAS

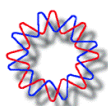
1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12:136-41.
2. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-3.
3. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2:61-3.
4. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* 68:171-7.
5. Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses, p. 1917-1974. In DM Knipe and PM Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. II. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
6. Ramig RF. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78:10213-20.
7. Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gomara M, Gray J. 2009. Rotaviruses and rotavirus vaccines. *Br Med Bull* 90:37-51.
8. Gonzalez RA, Torres-Vega MA, Lopez S, Arias CF. 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* 143:981-96.
9. Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR. 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol* 85:625-34.
10. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol* 4:118-21.
11. Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Estes MK, Prasad BV. 2012. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr Opin Virol* 2:380-8.
12. Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 70:5832-9.
13. Lopez S, Arias CF. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12:271-8.
14. Isa P, Sanchez-Aleman MA, Lopez S, Arias CF. 2009. Dissecting the role of integrin subunits alpha 2 and beta 3 in rotavirus cell entry by RNA silencing. *Virus Res* 145:251-9.
15. Martinez MA, Lopez S, Arias CF, Isa P. 2012. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J Virol* 87:1115-22.
16. Gutierrez M, Isa P, Sanchez-San Martin C, Perez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, Lopez S. 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 84:9161-9.
17. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* 78:2310-8.
18. Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Spencer E. 2004. Replication and transcription of the rotavirus genome. *Curr Pharm Des* 10:3769-77.



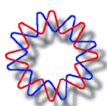
19. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. 2000. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res* 55:185-229.
20. Chemello ME, Aristimuno OC, Michelangeli F, Ruiz MC. 2002. Requirement for vacuolar H⁺-ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol* 76:13083-7.
21. McDonald SM, Patton JT. 2011. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol* 19:136-44.
22. Patton JT, Wentz M, Xiaobo J, Ramig RF. 1996. cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol* 70:3961-71.
23. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol* 78:7763-74.
24. Patton JT. 1995. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol* 76 (Pt 11):2633-44.
25. Schuck P, Taraporewala Z, McPhie P, Patton JT. 2001. Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J Biol Chem* 276:9679-87.
26. Patton JT. 1994. Rotavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 185:107-27.
27. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 10:165-77.
28. Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D. 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* 73:5411-21.
29. Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK. 2002. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108:71-81.
30. Poncet D. 2003. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell, p. 185-205. *In* UDaJ Gray (ed.), *Viral Gastroenteritis*, First ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
31. Vitour D, Lindenbaum P, Vende P, Becker MM, Poncet D. 2004. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J Virol* 78:3851-62.
32. Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17:5811-21.
33. Groft CM, Burley SK. 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9:1273-83.
34. Nakielnny S, Dreyfuss G. 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99:677-90.
35. Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-45.
36. Bushell M, Sarnow P. 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* 158:395-9.
37. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-63.



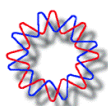
38. Valasek LS. 2012. 'Ribozoomin'--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). *Curr Protein Pept Sci* 13:305-30.
39. Walsh D, Mohr I. 2011. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* 9:860-75.
40. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7029-36.
41. Kapp LD, Lorsch JR. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73:657-704.
42. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113-27.
43. Nielsen PJ, Trachsel H. 1988. The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J* 7:2097-105.
44. Williams-Hill DM, Duncan RF, Nielsen PJ, Tahara SM. 1997. Differential expression of the murine eukaryotic translation initiation factor isogenes eIF4A(I) and eIF4A(II) is dependent upon cellular growth status. *Arch Biochem Biophys* 338:111-20.
45. Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Jr., Richter-Cook NJ, Merrick WC, Sonenberg N. 1999. Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol* 19:7336-46.
46. Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* 262:380-8.
47. Flynn A, Proud CG. 1995. Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270:21684-8.
48. Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, Beach CM, Stepinski J, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. 1995. Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J Biol Chem* 270:14597-603.
49. Scheper GC, Proud CG. 2002. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269:5350-9.
50. Lachance PE, Miron M, Raught B, Sonenberg N, Lasko P. 2002. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Mol Cell Biol* 22:1656-63.
51. Caron S, Charon M, Cramer E, Sonenberg N, Dusanter-Fourt I. 2004. Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol* 24:4920-8.
52. von der Haar T, Gross JD, Wagner G, McCarthy JE. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11:503-11.
53. Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S, Sonenberg N. 1998. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18:334-42.
54. Castello A, Alvarez E, Carrasco L. 2006. Differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J Biol Chem* 281:33206-16.



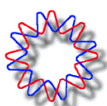
55. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4:223.
56. Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 273:13015-21.
57. Woods AJ, Kantidakis T, Sabe H, Critchley DR, Norman JC. 2005. Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. *Mol Cell Biol* 25:3763-73.
58. Woods AJ, Roberts MS, Choudhary J, Barry ST, Mazaki Y, Sabe H, Morley SJ, Critchley DR, Norman JC. 2002. Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem* 277:6428-37.
59. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19:104-13.
60. Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. 2003. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95:141-56.
61. Flint SJ, L.W. Enquist, V.R. Racaniello, and A.M. Skalka. 2004. Control of Translation, p. 379-419. *In* ASf Microbiology (ed.), Principles of Virology, Second ed.
62. Pelletier J, Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-5.
63. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-7.
64. Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N. 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273:14002-7.
65. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15:807-26.
66. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 15:2852-64.
67. Raught B, Gingras AC. 2007. Signaling to Translation Initiation, p. 369-400. *In* MB Mathews, N Sonenberg, and JWB Hershey (ed.), Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
68. Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. 1996. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 15:658-64.
69. Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4441-5.
70. Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. 1994. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11477-81.
71. Dever TE, Dar AC, Sicheri F. 2007. The eIF2 α Kinases, p. 319-344. *In* MB Mathews, N Sonenberg, and JWB Hershey (ed.), Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York.



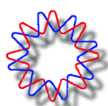
72. Schneider RJ, Mohr I. 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* 28:130-6.
73. Connor JH, Lyles DS. 2002. Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* 76:10177-87.
74. Xi Q, Cuesta R, Schneider RJ. 2004. Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev* 18:1997-2009.
75. Gingras AC, Sonenberg N. 1997. Adenovirus infection inactivates the translational inhibitors 4E-BP1 and 4E-BP2. *Virology* 237:182-6.
76. Cuesta R, Xi Q, Schneider RJ. 2000. Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J* 19:3465-74.
77. Dever TE. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108:545-56.
78. Yueh A, Schneider RJ. 2000. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* 14:414-21.
79. Ventoso I, MacMillan SE, Hershey JW, Carrasco L. 1998. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS Lett* 435:79-83.
80. Lloyd RE. 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Res* 119:76-88.
81. Smith RW, Gray NK. 2010. Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem J* 426:1-12.
82. Walsh D, Arias C, Perez C, Halladin D, Escandon M, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Mohr I. 2008. Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol Cell Biol* 28:2648-58.
83. Castello A, Quintas A, Sanchez EG, Sabina P, Nogal M, Carrasco L, Revilla Y. 2009. Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog* 5:e1000562.
84. Thivierge K, Cotton S, Dufresne PJ, Mathieu I, Beauchemin C, Ide C, Fortin MG, Laliberte JF. 2008. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* 377:216-25.
85. Sukarieh R, Sonenberg N, Pelletier J. 2010. Nuclear assortment of eIF4E coincides with shut-off of host protein synthesis upon poliovirus infection. *J Gen Virol* 91:1224-8.
86. Doudna JAS, P. 2007. Translation Initiation by Viral Internal Ribosome Entry Sites, p. 129-153. *In* MS Mathews, N.; Hershey, J.W.B. (ed.), *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
87. Arias C, Walsh D, Harbell J, Wilson AC, Mohr I. 2009. Activation of host translational control pathways by a viral developmental switch. *PLoS Pathog* 5:e1000334.
88. Blakqori G, van Knippenberg I, Elliott RM. 2009. Bunyamwera orthobunyavirus S-segment untranslated regions mediate poly(A) tail-independent translation. *J Virol* 83:3637-46.



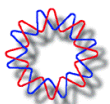
89. Dobrikova E, Shveygert M, Walters R, Gromeier M. 2010. Herpes simplex virus proteins ICP27 and UL47 associate with polyadenylate-binding protein and control its subcellular distribution. *J Virol* 84:270-9.
90. Salaun C, MacDonald AI, Larralde O, Howard L, Lochtie K, Burgess HM, Brook M, Malik P, Gray NK, Graham SV. 2010. Poly(A)-binding protein 1 partially relocates to the nucleus during herpes simplex virus type 1 infection in an ICP27-independent manner and does not inhibit virus replication. *J Virol* 84:8539-48.
91. Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, Brown SC, Bolte S, Arold ST, Poncet D. 2008. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* 82:11283-93.
92. Montero H, Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J Virol* 82:1496-504.
93. Poncet D, Aponte C, Cohen J. 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67:3159-65.
94. Varani G, Allain FH. 2002. How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nat Struct Biol* 9:158-60.
95. Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74:7064-71.
96. Montero H, Arias CF, Lopez S. 2006. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 80:9031-8.
97. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, Lopez S. 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol* 83:8819-31.
98. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
99. Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, Sonenberg N. 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *Rna* 7:382-94.
100. Kumar GR, Glaunsinger BA. 2010. Nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA. *Mol Cell Biol* 30:4996-5008.
101. Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 17:7480-9.
102. Castello A, Sanz MA, Molina S, Carrasco L. 2006. Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* 355:942-56.
103. Rogers GW, Jr., Richter NJ, Lima WF, Merrick WC. 2001. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* 276:30914-22.



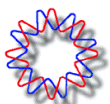
104. Rogers GW, Jr., Richter NJ, Merrick WC. 1999. Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem* 274:12236-44.
105. Korneeva NL, First EA, Benoit CA, Rhoads RE. 2005. Interaction between the NH2-terminal domain of eIF4A and the central domain of eIF4G modulates RNA-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* 280:1872-81.
106. Altmann M, Blum S, Wilson TM, Trachsel H. 1990. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA mediates initiation-factor-4E-independent, but still initiation-factor-4A-dependent translation in yeast extracts. *Gene* 91:127-9.
107. Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau ME, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, Roberts LO, Goodfellow IG. 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem* 281:25315-25.
108. Mir MA, Panganiban AT. 2008. A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J* 27:3129-39.
109. Chizhikov V, Patton JT. 2000. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *Rna* 6:814-25.
110. Whitlow ZW, Connor JH, Lyles DS. 2008. New mRNAs are preferentially translated during vesicular stomatitis virus infection. *J Virol* 82:2286-94.
111. Beltz GA, Flint SJ. 1979. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol* 131:353-73.
112. Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzweig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM. 2007. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1853-8.
113. Gustin KE, Sarnow P. 2001. Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J* 20:240-9.
114. Her LS, Lund E, Dahlberg JE. 1997. Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 276:1845-8.
115. Castello A, Izquierdo JM, Welnowska E, Carrasco L. 2009. RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage. *J Cell Sci* 122:3799-809.
116. Faria PA, Chakraborty P, Levay A, Barber GN, Ezelle HJ, Enninga J, Arana C, van Deursen J, Fontoura BM. 2005. VSV disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Mol Cell* 17:93-102.
117. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, Lopez S. 2011. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *J Virol* 85:12594-604.
118. Arnold MM, Brownback CS, Taraporewala ZF, Patton JT. 2012. Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *J Gen Virol* 93:1483-94.
119. Kumar GR, Shum L, Glaunsinger BA. 2011. Importin alpha-mediated nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein occurs as a direct consequence of cytoplasmic mRNA depletion. *Mol Cell Biol* 31:3113-25.
120. Burgess HM, Gray NK. 2012. An integrated model for the nucleo-cytoplasmic transport of cytoplasmic poly(A)-binding proteins. *Commun Integr Biol* 5:243-7.



-
121. **Gaglia MM, Covarrubias S, Wong W, Glaunsinger BA. 2012. A common strategy for host RNA degradation by divergent viruses. J Virol 86:9527-30.**



ANEXO



Rotavirus Prevents the Expression of Host Responses by Blocking the Nucleocytoplasmic Transport of Polyadenylated mRNAs

Rosa M. Rubio, Silvia I. Mora, Pedro Romero, Carlos F. Arias and Susana López

J. Virol. 2013, 87(11):6336. DOI: 10.1128/JVI.00361-13.

Published Ahead of Print 27 March 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://jvi.asm.org/content/87/11/6336>

REFERENCES

These include:

This article cites 44 articles, 28 of which can be accessed free at: <http://jvi.asm.org/content/87/11/6336#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://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Rotavirus Prevents the Expression of Host Responses by Blocking the Nucleocytoplasmic Transport of Polyadenylated mRNAs

Rosa M. Rubio,^a Silvia I. Mora,^{a,b} Pedro Romero,^a Carlos F. Arias,^a Susana López^a

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico^a; Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^b

Rotaviruses are the most important agent of severe gastroenteritis in young children. Early in infection, these viruses take over the host translation machinery, causing a severe shutoff of cell protein synthesis while viral proteins are efficiently synthesized. In infected cells, there is an accumulation of the cytoplasmic poly(A)-binding protein in the nucleus, induced by the viral protein NSP3. Here we found that poly(A)-containing mRNAs also accumulate and become hyperadenylated in the nuclei of infected cells. Using reporter genes bearing the untranslated regions (UTRs) of cellular or viral genes, we found that the viral UTRs do not determine the efficiency of translation of mRNAs in rotavirus-infected cells. Furthermore, we showed that while a polyadenylated reporter mRNA directly delivered into the cytoplasm of infected cells was efficiently translated, the same reporter introduced as a plasmid that needs to be transcribed and exported to the cytoplasm was poorly translated. Altogether, these results suggest that nuclear retention of poly(A)-containing mRNAs is one of the main strategies of rotavirus to control cell translation and therefore the host antiviral and stress responses.

Due to their limited coding capacity, viruses are obligate intracellular parasites and depend on the cell translation machinery to synthesize their proteins. The replication of a virus requires that viral mRNAs compete successfully with cellular mRNAs for the host translation apparatus. Viruses have developed remarkable strategies to ensure the efficient translation of their mRNAs while simultaneously inhibiting cellular protein synthesis. While every step of the translation process is amenable to regulation, under most circumstances mRNA translation is regulated primarily at the level of initiation (1). Translation initiation is a complex process that begins with the recognition of the cap nucleotide structure (m⁷GpppN) at the 5' end of mRNAs by the cap binding protein eIF4E, which is part of the cap-binding complex eIF4F. This complex is composed of eIF4E, the ATP-dependent RNA helicase eIF4A, and the scaffolding protein eIF4G. eIF4G also interacts with the cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABPC), which in turn binds to the 3' poly(A) tail of mRNAs. These interactions are thought to promote the circularization of the mRNA molecules to stimulate translation (2, 3). The binding of Met-tRNA to the 40S ribosomal subunit is mediated by a ternary complex composed of eIF2-GTP-Met-tRNA. Once the 40S ribosomal subunit is bound to the mRNA, it is thought to scan the mRNA in the 5'-to-3' direction (4). The AUG codon that is most proximal to the cap and flanked by optimal consensus sequences is usually selected for initiation (5). The release of eukaryotic translation initiation factors (eIFs) is assisted by eIF5, which facilitates the hydrolysis of GTP carried out by eIF2. The GDP on eIF2 is exchanged for GTP by eIF2B in a regulated manner that is essential for ensuing rounds of initiation (6). Different kinds of stress reduce global translation by triggering the phosphorylation of the α subunit of eIF2 (eIF2 α). This phosphorylation inhibits the exchange of GDP for GTP catalyzed by eIF2B, which is then sequestered in a complex with eIF2, preventing translation reinitiation. Even though PABPC is predominantly cytoplasmic, this protein has been detected in the nuclei of mammalian cells associated with nuclear pre-mRNPs (7–11). Thus, PABPC is regarded as a shut-

ting protein that participates in the maturation and nuclear export of mRNAs.

Rotaviruses are the most important cause of viral diarrhea in infants and young children, being responsible for an estimated incidence of 600,000 annual deaths worldwide (12) and placing a significant economic burden on the global health care system. These nonenveloped viruses are formed by three concentric layers of protein that enclose a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA). The transcripts made by these viruses serve two functions in infected cells: as mRNAs to direct the synthesis of viral proteins and as templates for the synthesis of the minus-strand RNA to replicate the genome. Except for segment 11 mRNA, which is dicistronic, the mRNAs of rotavirus are monocistronic, coding for a total of six structural (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural (NSP1 to NSP6) proteins (13).

Early in the infection process, rotaviruses take over the host translation machinery, causing a severe shutoff of cell protein synthesis. Rotavirus mRNAs are capped, but they are not polyadenylated; instead, they have a consensus sequence at their 3' end (GACC) that is conserved in all 11 viral genes (14) and which is bound by the amino-terminal domain of the viral nonstructural protein NSP3. This protein also binds, through its carboxy-terminal domain, to eIF4GI, in the same region used by PABPC but with higher affinity (15, 16); thus, it was proposed that during rotavirus infection, NSP3 evicts PABPC from eIF4GI, impairing the translation of cellular mRNAs while leading to the enhancement of translation of rotaviral mRNAs (15, 17, 18). Furthermore, it has been reported that in rotavirus-infected cells, PABPC accu-

Received 4 February 2013 Accepted 20 March 2013

Published ahead of print 27 March 2013

Address correspondence to Susana López, susana@ibt.unam.mx.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00361-13

mulates in the cell nucleus, and this relocalization depends on NSP3 through a still-unknown mechanism (19, 20). We have found that while NSP3 indeed blocks the translation of cellular mRNAs, this nonstructural protein is not needed for the translation of viral mRNAs (21). More recently, Arnold et al. characterized a rotavirus variant containing a rearrangement in the gene for NSP3. This variant no longer binds efficiently to eIF4G, has a decreased capacity to suppress the translation of cellular mRNAs, and does not induce the accumulation of PABPC in the cell nucleus, yet viral protein synthesis and viral replication are not affected (22), thus supporting the observations that the synthesis of viral proteins is independent of NSP3. Rotavirus-induced inhibition of cell protein synthesis also seems to be mediated by a second mechanism, since eIF2 α becomes phosphorylated early after infection and is maintained in this state throughout the virus replication cycle (20).

Despite the severe inhibitory translation conditions imposed in the host cell by the infection, the viral mRNAs are efficiently translated. In this work, we characterized the relevance of the nuclear accumulation of PABPC and the consequences of this relocalization for the translation of cellular mRNAs in rotavirus-infected cells. Taken together, our results suggest that the shutoff of cell protein synthesis during the infection is a multifactorial process, where the inhibition of transport of cellular mRNAs from the nucleus to the cytoplasm seems to be the most determinant factor in preventing the translation of poly(A)-containing mRNAs and thus the antiviral and stress responses of the cell.

MATERIALS AND METHODS

Cells, virus, and antibodies. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in advanced medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM]—reduced serum) (HyClone, Logan, UT) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and was used for all experiments carried out in this work. Rhesus rotavirus (RRV) was obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA). The virus was propagated in MA104 cells as described previously (23). Prior to the infection, RRV was activated with trypsin (10 μ g/ml; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) for 30 min at 37°C. Rabbit polyclonal sera to NSP2 and to NSP3 have been described previously (24). Polyclonal antibodies to purified RRV triple-layered particles (TLPs) and to vimentin were produced in rabbits as described previously (25). Monoclonal antibody to PABPC and polyclonal antibody to eIF4GI were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The polyclonal antibody to the C-terminal region of eIF4GII was a gift from N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada); Alexa Fluor 488- and 647-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA), and streptavidin coupled to horseradish peroxidase and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G were from Zymed (San Francisco, CA).

Immunofluorescence. MA104 cells grown in coverslips were infected or not with rotavirus RRV. At different times postinfection, cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, and the coverslips were washed four times with phosphate-buffered saline (PBS) with 50 mM ammonium chloride. The fixed cells were permeabilized by incubation in 0.5% Triton X-100 in PBS with 50 mM ammonium chloride and 1% bovine serum albumin (BSA) and then were blocked by incubation with 1% BSA and 50 mM NH₄Cl in PBS at 4°C overnight. The coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature, followed by incubation with the corresponding secondary antibody for 1 h at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Fluoprep medium (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The slides

were analyzed using an E600 epifluorescence microscope coupled to a DXM1200 digital still camera (Nikon, Tokyo, Japan).

Immunoblot analysis. Cells were lysed for 15 min at 4°C in lysis buffer containing 25 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM Tris (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, and 1% Triton X-100, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete, EDTA free; Roche, Basel, Switzerland). The lysates were centrifuged for 5 min at 10,000 \times g, and the supernatants were collected. Samples were diluted in Laemmli sample buffer, denatured by boiling for 5 min, subjected to 10%-sodium dodecyl sulfate-7.5% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-7.5% PAGE), and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked by incubation with 5% nonfat dry milk in PBS for 1 h at room temperature and with primary antibodies diluted in PBS containing 5% milk, followed by an incubation with secondary, species-specific, horseradish peroxidase-conjugated antibodies. The peroxidase activity was developed using the Western Lightning chemiluminescence reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA), following the manufacturer's instructions.

FISH of poly(A)-containing RNAs. To detect the subcellular localization of the polyadenylated mRNAs, the protocol of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) described by Mingle et al. (26) was followed. Briefly, MA104 cells were grown in coverslips and infected with RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 3. At 6 h postinfection (hpi), cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, washed twice with 50 mM NH₄Cl in PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100, and incubated for 30 min at room temperature with 1.5% H₂O₂. Fixed cells were incubated overnight at 37°C with 120 μ l (0.2 ng/ μ l) of a biotin-labeled oligo(dT) probe in hybridization buffer (5 \times SSC [0.75 M NaCl and 0.075 M sodium citrate], 20 mg/ml heparin, 0.1% Tween 20, and 1 μ g/ml of total yeast RNA). Then, the cells were washed three times with hybridization buffer at 37°C and three times with 0.1 \times SSC and blocked with blocking buffer (1% BSA, 0.2% nonfat milk, and 0.3% Triton X-100) for 1 h at room temperature. The RNA probe was detected by incubating the cells with streptavidin conjugated to peroxidase for 1 h at room temperature. After this step, the fluorescence signal for RNA detection was obtained by using the tyramide signal amplification (TSA) system (TSA-Plus fluorescence palette system; PerkinElmer, Boston, MA) as recommended by the manufacturer. For simultaneous protein immunodetection, specific antibodies were added during the streptavidin incubation (all antibodies were diluted 1:1,000); cells were washed five times with TNT buffer (0.1 M Tris [pH 7.5], 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20), incubated with the corresponding secondary antibody for 1 h at 37°C, and washed five times with TNT buffer. Finally, the cells were mounted on glass slides with Fluoprep medium (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and the slides were analyzed using an E600 epifluorescence microscope coupled to a DXM1200 digital still camera (Nikon, Tokyo, Japan).

siRNA transfection. The small interfering RNA (siRNA) directed to eIF4GII had the sequence GGUCCUUUUUAUCCUGGAC (sense) and GUCCAGGAUAAAAAGGACC (antisense), corresponding to nucleotides 533 to 551 of the human eIF4GII gene (GenBank accession number NM_003760). The siRNAs to eIF4GI and to NSP3 used in this work were previously described (21). As an irrelevant control (siRNAIrre), an siRNA directed to the green fluorescent protein was used. All siRNAs were purchased from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Transfection of the siRNAs into MA104 cells was performed as previously described (25). Briefly, 2 μ l of Lipofectamine (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) was added to 100 μ l of 600-pmol/ml siRNAs in minimal essential medium (MEM) without antibiotics and incubated for 20 min at room temperature. The transfection mixture was then added to confluent MA104 cell monolayers previously washed with MEM and incubated for 8 h at 37°C. After this incubation period, the transfection mixture was removed, and the cells were kept in DMEM for 48 h at 37°C prior to infection.

Transfection of siRNA to NSP3 was performed using a reverse transfection method described previously (27). Briefly, a mixture containing

TABLE 1 Oligonucleotides used in this work

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')
KasT7-5'fw	AGC AGA TCT AGG ACC AAG CT
5ATGSpeRev	GCG ACT AGT CAT GTT GAA GAC TTC GTT
5'lucSpeI	ACG CAC TAG TGA AGA CGC CAA AAA C
3'lucBglII	GGA AGA TCT ACA ATT TGG ACT TTC CG
VP63'fw	AGC AGA TCT AGG ACC AAG CT
YM6-3'	CAG ACC CGG GCC GCG GTC ACA TCC TCT CAC T
Kas/T7/Gluc	CGC GGC GCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCT TGG TAC
Gluc/MfeI	GAA TGC AAT TGT TGT TGT TAC
Gluc Forward	CAC GCC CAA GAT GAA GAA GT
Gluc Reverse	TTG AAC CCA GGA ATC TCA GG

the Oligofectamine reagent (15 μ l/ml) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) and 200 pmol/ml of the siRNA was added to wells of 48-well plates and incubated for 20 min at room temperature. After this period, 200 μ l of a single cell suspension of 1.5×10^5 MA104 cells/ml was added to each well and incubated for 48 h at 37°C before being infected.

mRNA transfection. *In vitro*-transcribed mRNAs were lipofected into MA104 cells by incubating cell monolayers with MEM containing Lipofectamine 2000 (40 μ g/ml) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) and 2.5 μ g/ml of mRNA for 2 h at 37°C. After this time, the transfection mixture was removed, and the cells were washed four times with MEM and incubated for 30 min at 37°C with 10 mg/ml RNase A in MEM to remove the extracellular nonspecifically bound RNA. Then, the cells were washed four times with 1% BSA in MEM and four times with MEM and incubated at 37°C for different times. Rotavirus infection of transfected cells was done by immediately adding virus to the previously washed cells.

Plasmid transfection. The pTK-GLuc plasmid, which has the coding sequence for *Gaussia* luciferase (Gluc), was obtained from New England BioLabs (Ipswich, MA). The plasmid was transfected into confluent cell monolayers using Lipofectamine LTX (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, MA104 cells were incubated for 3 h at 37°C with a mixture of Lipofectamine LTX (40 μ g/ml) and 7.5 μ g/ml of the plasmid. After this time, the transfection mixture was replaced by MEM, and cells were incubated for different times before being infected or harvested.

Luciferase assays. MA104 cells transfected with the indicated mRNAs expressing *Renilla* or firefly luciferases were lysed at different times, and the cellular lysates were divided into two fractions: one fraction was used to extract RNA with TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, and the other fraction was assayed in duplicate using the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI) for firefly and *Renilla* luciferase activities. For cells expressing *Gaussia* luciferase, the cell medium was used to measure the activity of this protein using the BioLux *Gaussia* luciferase assay kit (New England BioLabs, Ipswich, MA), according to the manufacturer's instructions, while the cells were used to extract RNA using the TRIzol reagent. Luminescence was measured in the Monolight 2010 apparatus (Analytical Luminescence Laboratory, Ann Arbor, MI).

Plasmid constructions. Plasmid pGEM-vFv was constructed as follows; pGEM3Z (Promega) was used as a backbone to introduce, at the KasI and SmaI sites, the firefly luciferase open reading frame (ORF) from pGL3 Basic (Promega) flanked by the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of RRV gene segment 6. Oligonucleotides KasT7-5'fw and 5ATG-SpeRev (Table 1) were used to introduce the 5'VP6 UTR preceded by a T7 promoter and ending at a SpeI site next to the ATG of the firefly *luc* gene. The firefly *luc* ORF was amplified using oligonucleotides 5'lucSpeI and 3'lucBglII (Table 1), which introduced SpeI and BglII sites at the 5' end next to the ATG and a BglII site after the stop codon, respectively, of the firefly ORF; the 3' UTR of gene segment 6 was amplified by PCR using

oligonucleotides VP63'fw and YM6-3' (Table 1), which introduced BglII and SmaI sites at the 5' and 3' ends, respectively.

Plasmid pBF-cRc was constructed by subcloning the *Renilla* luciferase ORF digested from plasmid pRL-CMV (Promega) with XbaI, treating the linearized plasmid with T4DNA polymerase to blunt end the terminal overhangs, and then digesting the plasmid with NheI. After gel purification, the fragment was ligated to the pOO2 expression vector (kindly provided by O. Pantoja, Instituto de Biotecnología, UNAM, Mexico City, Mexico), which contains the 5' and 3' UTRs of the *Xenopus laevis* β -globin gene (GenBank accession number NM_001096347.1), previously digested with XbaI and PvuII. In plasmid pOO2, the 5' UTR of the globin gene is preceded by an SP6 promoter, and at the end of the 3' UTR, it contains a stretch of 60 adenines followed by an MfeI site. All constructs were verified by sequencing.

***In vitro* RNA transcription.** To obtain vFv and rotavirus gene 10 capped mRNAs, plasmids pGEM-vFv and pGEM-NSP4 (28) were linearized with SacII (New England BioLabs, Ipswich, MA) and purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. The linearized plasmids were used as templates for *in vitro* transcription using the MEGAscript T7 kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the instructions of the manufacturer, in the presence of a cap analog. The T7 polymerization mixture contained 1 μ g of linearized DNA, 7.5 mM (each) ATP, CTP, and UTP, 1.5 mM GTP, and 6 mM cap analog (New England BioLabs). Similarly, mRNA from plasmid pBF-cRc was obtained by *in vitro* transcription of the MfeI-linearized plasmid using the MEGAscript SP6 kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the instructions of the manufacturer, in the presence of a cap analog. To *in vitro* transcribe the Gluc coding region, oligonucleotides Kas/T7/Gluc and Gluc/MfeI (sequences in Table 1) were used to PCR amplify the Gluc ORF and to introduce a T7 promoter at the 5' end and a MfeI site at the 3' end. The PCR product was digested with MfeI, treated with proteinase K (2 mg/ml), and phenol and chloroform extracted. The purified PCR product was used as a template for *in vitro* transcription using the MEGAscript T7 kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA), in the presence of a cap analog as previously mentioned. After transcription, the Gluc mRNA was *in vitro* polyadenylated using *Escherichia Coli* poly(A) polymerase (New England BioLabs) for 20 min at 37°C. The increase in size of the polyadenylated transcript was verified by running the mRNA in a 1% agarose gel in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer.

Real-time RT-PCR analysis. Purified total RNA extracted from cell lysates was treated with RNA-free DNase (Roche, Basel, Switzerland) to eliminate possible DNA contamination. *Gaussia* luciferase mRNA was amplified using the primers Gluc forward and Gluc reverse (Table 1). The primers used to amplify *grp78*, *grp94*, firefly luciferase, *Renilla* luciferase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAs have been described previously (28–30). The level of each mRNA was determined by one-step real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) as previously reported (29). Quantitative analysis of data was performed using the Prism 7000 analysis software program (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). The results were normalized to the levels of total GAPDH mRNA detected in each RNA sample. The changes in gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, where C_T is the threshold cycle (31).

Northern blotting. Total cellular RNA was isolated for Northern blotting using the TRIzol reagent, resolved on 0.8% agarose-formaldehyde gels, transferred to Hybond-N⁺ membranes (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), and probed with a ³²P-labeled *grp78* DNA oligonucleotide, which was labeled using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA). RNase H digestions were carried out with 10 to 13 μ g of total RNA combined with 500 pmol of the oligo(dT)₁₅ primer. After incubation at 65°C for 8 min, 1 U of RNase H (New England Biolabs, Ipswich, MA) and 40 U of RNasin (Promega, Madison, WI) were added to 1 \times RNase H buffer, followed by incubation at 37°C for 30 min. The RNA was extracted using the TRIzol reagent and

subjected to gel electrophoresis. Northern blots were analyzed using a Typhoon 8600 phosphorimager.

Viral mRNA quantitation. Confluent MA104 cells in 48-well plates were infected with RRV and harvested at different time points using the TRIzol reagent. Total RNA was purified and treated with RNA-free DNase (Roche, Basel, Switzerland) to eliminate possible DNA contamination. The primers used for the amplification of gene 10 of rotavirus have been described previously (28). To determine specifically the levels of each RNA strand, RT-PCR was performed, separating the reverse transcription and PCR steps, as described by Ayala-Breton et al. (28). In each assay, a standard curve was generated by amplifying known amounts of *in vitro*-transcribed rotavirus gene 10 mRNA using the reverse primer during the RT step. The quantitative analysis of data was performed using the ABI Prism 7000 analysis software program. After PCR amplification, the ABI Prism software was used to set a cutoff line with the obtained fluorescence values (y axis) for all the samples between the logarithmic phases of the amplification curves. Then, the logarithm of the concentration of each sample was plotted against the cycle number, where the amplification curve of the sample reached the cutoff line (C_T). The amount of positive- or negative-strand RNA from unknown samples was determined by extrapolating the C_T value onto the corresponding standard curve.

Preparation of cytoplasmic and nuclear extracts. Confluent MA104 cells were harvested by trypsinization, washed twice with PBS, and collected by centrifugation. Cells were resuspended and lysed by incubation in buffer 1 (25 mM HEPES, pH 7.9, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol [DTT], and 0.5% [vol/vol] NP-40 supplemented with a protease inhibitor cocktail, Complete [Roche]) for 15 min at 4°C. Nuclei were harvested by centrifugation (5,000 rpm, 5 min), and the resulting supernatant was collected as cytoplasmic extract. The pelleted nuclei were washed once in buffer 2 (25 mM HEPES, pH 7.9, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and 0.25% [vol/vol] NP-40 supplemented with a protease inhibitor cocktail). Total RNA was extracted from cytoplasmic and nuclear fractions using the TRIzol reagent.

Extraction of polyadenylated mRNAs. After total RNA was extracted from cytoplasmic and nuclear fractions as described above, polyadenylated mRNAs were isolated using the Oligotex Direct mRNA minikit (Qiagen, Germantown, MD) as described by the manufacturer, and the concentration of eluted poly(A)-containing RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm in an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

RESULTS

Rotavirus infection induces the accumulation of poly(A)-containing mRNAs in the nucleus. It has been previously shown that during rotavirus infection, PABPC accumulates in the cell nucleus (19, 20), and this accumulation depends on the presence of NSP3. To determine if the localization of poly(A)-containing mRNAs was also modified in rotavirus-infected cells, we performed a fluorescent *in situ* hybridization (FISH) assay to visualize the cellular localization of the polyadenylated mRNAs. In these experiments, MA104 cells were infected or not with RRV, fixed, and hybridized with a biotin-labeled oligo(dT) probe, complementary to the poly(A) tail; cells were also treated with an siRNA directed to NSP3 or with a control, irrelevant siRNA directed to GFP to establish if the nuclear accumulation of poly(A)-containing mRNAs was related to the presence or absence of this nonstructural protein. Cells were also immunostained with antibodies directed to NSP3 to verify the silencing of this protein during the infection. Figure 1A shows that while the polyadenylated mRNAs were homogeneously distributed in the cytoplasm and in the nucleus of uninfected cells transfected with a control siRNA, the hybridization signal of these mRNAs decreased in the cytoplasm of infected cells but not in the nucleus, where they appear to concentrate. The

signal observed is specific of the hybridization of the biotin-labeled oligo(dT) probe, since we did not detect any fluorescent signal when no probe was added (but peroxidase-conjugated streptavidin and TSA reagent were included). In contrast, when the expression of NSP3 was silenced in infected cells, the distribution of mRNAs with a poly(A) tail appeared very similar to that observed in uninfected cells, indicating that NSP3 is involved in the nuclear accumulation both of PABPC and of poly(A)-containing mRNAs.

It has been previously shown that NSP3 binds to eIF4G at the same place that PABPC does but with higher affinity, evicting it from the eIF4F complex, and it was suggested that this displacement of PABPC from the eIF4F complex by NSP3 during the infection might cause the nuclear accumulation of PABPC; if this were the case, silencing the expression of eIF4GI or eIF4GII or both would have the same effect on PABPC cellular localization. To determine if the relocalization of PABPC to the nucleus is due to its eviction from its binding site in the eIF4F complex, the expression of eIF4GI and that of eIF4GII were silenced, and the effect of these knockdowns on the subcellular localization of PABPC was assessed by immunofluorescence (IF) staining. MA104 cells were transfected with siRNAs directed to eIF4GI, eIF4GII, or a combination of both; 48 h posttransfection (hpt), the cells were infected or mock infected, and 9 h postinfection (hpi), cells were fixed and immunostained with antibodies to NSP2, to PABPC, and to eIF4GI (Fig. 1B); it was not possible to stain eIF4GII in these assays, since the antibody we used did not work for IF, but the knockdown of this protein was determined by Western blotting (Fig. 1C). We found that the distribution of PABPC changed only in rotavirus-infected cells transfected with an irrelevant siRNA. When the expression of eIF4GI, eIF4GII, or a combination of both was silenced, the distribution of PABPC did not change (Fig. 1B). These results suggest that the nuclear accumulation of PABPC is not directly due to its lack of interaction with eIF4GI and/or II but most likely is due to an additional effect caused by NSP3.

The UTRs do not determine the translation efficiency of reporter mRNAs. Once we found that during rotavirus infection the poly(A)-containing mRNAs were accumulated in the nucleus, we decided to characterize the translation efficiency of reporter mRNAs containing either viral or cellular untranslated regions (UTRs) in rotavirus-infected cells. To evaluate this, we constructed transcription plasmids that direct the synthesis of two reporter mRNAs (Fig. 2A). The vFv RNA contains the firefly luciferase ORF flanked by the 23 and 123 nucleotides (nt) of the 5' and 3' UTRs of RRV gene 6, respectively, while the cRc mRNA contains the *Renilla* luciferase ORF flanked by the 19 and 125 nt of the 5' and 3' UTRs of the *Xenopus* globin gene; at the end of the 3' UTR of the globin gene, a stretch of 60 adenines was introduced in the transcription plasmid. *In vitro*-transcribed vFv and cRc mRNAs were transfected into MA104 cells either before or after virus infection or mock infection, and the luciferase activities and the amount of transfected mRNA present under each condition were determined 10 hpt (Fig. 2B). The translation efficiencies of the transfected mRNAs were determined by normalizing the detected luciferase activities with the level of the corresponding mRNA, quantitated by real-time RT-PCR (qRT-PCR) (Fig. 2C). The translation levels of the vFv and cRc mRNAs in infected cells were compared to those in mock-infected cells. It was observed that the translation of both mRNAs was very similar when transfected in

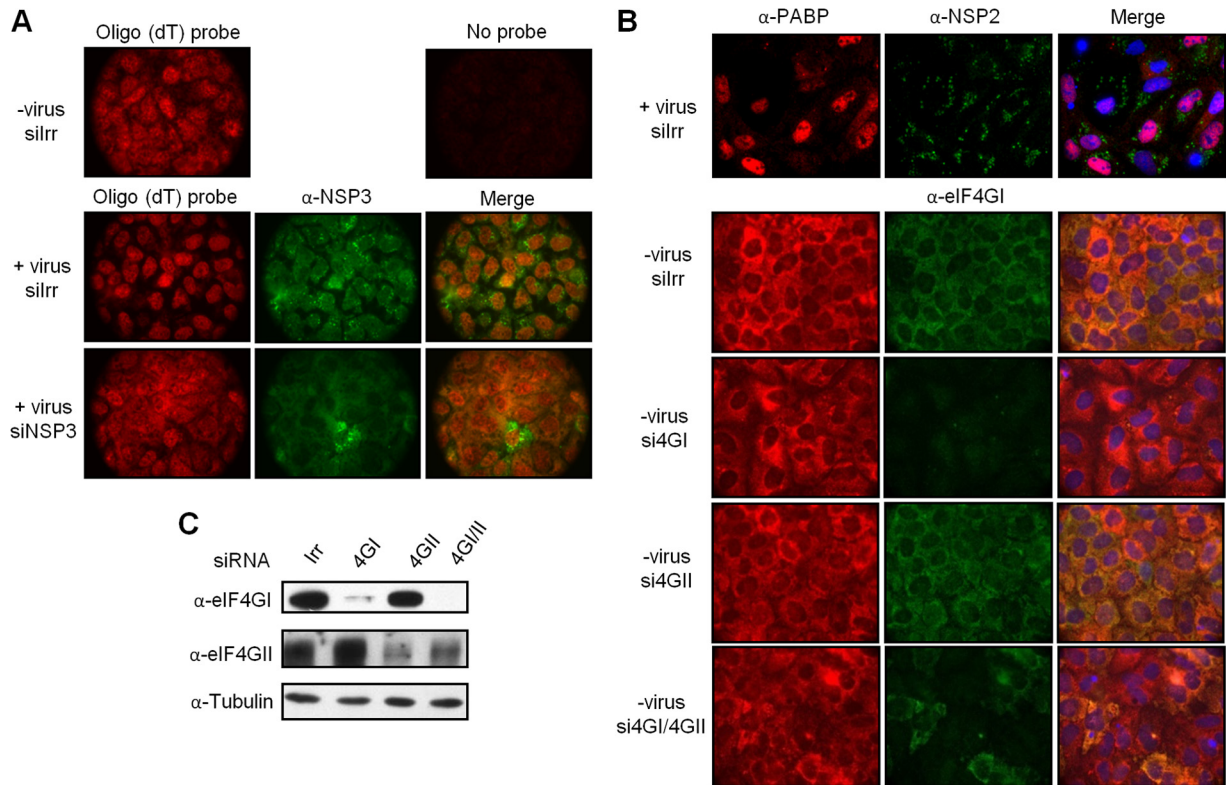


FIG 1 Polyadenylated mRNAs accumulate in the nucleus of infected cells. MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs to NSP3, eIF4GI (si4GI), eIF4GII (si4GII), a combination of both siRNAs (si4GI/4GII), or an irrelevant sequence (siRR); 48 h posttransfection (hpt), the cells were infected with RRV (+virus), or mock infected (-virus), and 9 h postinfection (hpi), the cells were fixed, permeabilized, and hybridized with a biotin-labeled oligo(dT) probe or with no probe and immunostained with anti-NSP3 (A) or immunostained with anti-NSP2, anti-PABPC, and anti-eIF4GI (B), as indicated in Materials and Methods. Proteins or bound probe were detected using the indicated antibodies and secondary Alexa-conjugated antibodies. The fluorescence signal corresponding to the bound probe was developed using a tyramide signal amplification system (TSA) (PerkinElmer). Cell nuclei were stained with 4,6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), shown in blue. (C) In parallel wells, cells were transfected with the indicated siRNAs as for panel B, and 48 hpt, cells were lysed and the proteins were resolved in an SDS-7% PAGE and detected by immunoblot analysis with the indicated antibodies.

cells before the infection. Surprisingly when the reporter mRNAs were transfected in cells that had been previously infected, the translation of both mRNAs was greatly increased; under these conditions the translation of the vFv reporter mRNA was slightly better (although this was not statistically significant) than that of the reporter cRc (Fig. 2C). These results suggest that there is no significant difference in the translation efficiencies of mRNAs containing either viral or cellular UTRs and also suggest that once the cells have been infected, there is a change in the translation machinery that makes it more efficient.

The nucleocytoplasmic transport of reporter mRNAs is blocked in rotavirus-infected cells. We found that a cellular mRNA-like, *in vitro*-transcribed mRNA was efficiently translated when transfected into infected cells; this observation, however, is in conflict with the fact that in rotavirus-infected cells, there is a severe shutoff of cellular protein synthesis. To determine if the efficient translation of transfected mRNAs was due to their direct delivery into the cell's cytoplasm, we compared the translation efficiency of a *Gaussia* luciferase (Gluc) reporter mRNA that was delivered to cells either by transfecting a plasmid that encodes this mRNA or by introducing the mRNA transcribed *in vitro* from the same plasmid. The rationale for this experiment was that the plasmid-encoded Gluc gene is transcribed in the nucleus of the cell, and to be translated it has to be transported to the cell's cytoplasm.

On the other hand, the transfected mRNA will be delivered directly into the cytoplasm, ready for its translation. The *in vitro*-transcribed Gluc mRNA was polyadenylated using poly(A) polymerase to discard differences in the 3' ends of the *in vivo* and *in vitro* transcribed mRNAs. We found that the activity of Gluc expressed from the plasmid in infected cells was about 10-fold less than that in mock-infected cells. In contrast, the amount of Gluc expressed from *in vitro*-transcribed mRNA was about 4 times higher in rotavirus-infected cells than in mock-infected cells (Fig. 3A). To discard differences in mRNA transcription or RNA degradation between these conditions, the activity of *Gaussia* luciferase was normalized to the amount of Gluc mRNA, which was quantitated by qRT-PCR under each condition. To establish if the presence of NSP3 in rotavirus-infected cells was responsible for the reduced activity of Gluc when the reporter was introduced as a plasmid, we silenced the expression of NSP3 by RNA interference (RNAi) (Fig. 3B). We found that when NSP3 was knocked down, the activity of Gluc expressed from the plasmid was very similar to its expression in mock-infected cells, i.e., it seemed that it was no longer inhibited in infected cells, whereas the expression of the *in vitro*-transcribed reporter mRNA was not significantly affected under these conditions. These results suggest that translation of polyadenylated mRNAs is inhibited in rotavirus-infected cells not by a regulation step during the translation process itself but rather

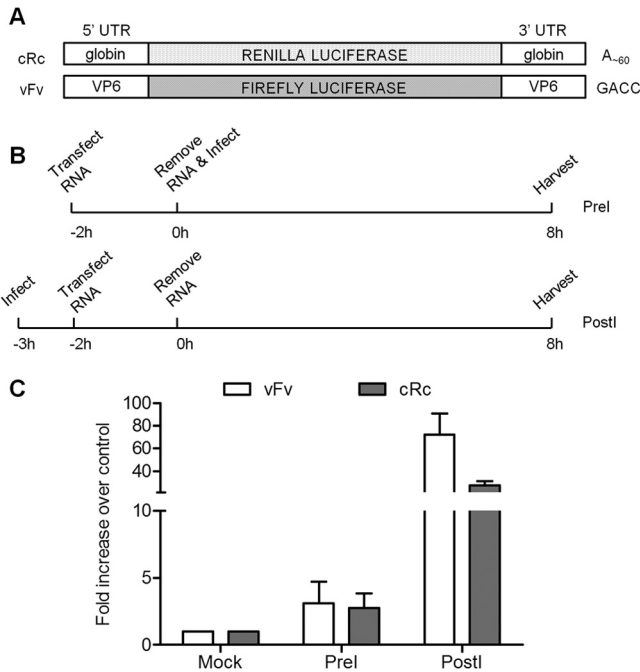


FIG 2 The 5' and 3' UTRs do not determine the translation efficiency of reporter mRNAs. (A) Schematic representation of the chimeric reporter mRNAs cRc and vFv. cRc contains the *Renilla* luciferase ORF flanked by 19 and 125 nt of the globin gene, respectively. The mRNA also contains a tail of poly(A), which was introduced in the template plasmid; vFv contains the firefly luciferase ORF flanked by 23 and 139 nt of the 5' and 3' UTRs, respectively, of RRV gene segment 6. (B) Experimental design for analyzing luciferase synthesis in MA104 cells transfected at two different times relative to the time of infection. cRc or vFv mRNAs were transfected into mock-infected MA104 cells (Mock), 2 h before the infection with RRV rotavirus (PreI), or just after the virus adsorption period (PostI). (C) Ten hours after RNA transfection, the cells were lysed, and the activity of each luciferase was measured and normalized to the amount of the corresponding transfected mRNA that was quantitated in the same lysate by real-time RT-PCR (qRT-PCR). The activities are expressed as a fold increase of the normalized activity obtained when the respective mRNA (cRc or vFv) was transfected in mock-infected cells, which was set as 1. The arithmetic mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate is shown.

by blocking of the export of mRNAs from the nucleus to the cytoplasm, and NSP3 seems to be directly or indirectly involved in this blockage.

The subcellular localization of cellular mRNAs changes in rotavirus-infected cells. To establish if the inhibition of nucleocytoplasmic transport of mRNAs that we found with the Gluc reporter mRNA also affected endogenous cellular mRNAs, we determined the subcellular distribution of three cellular mRNAs, grp78, grp94, and GAPDH, in infected cells. We have previously reported that during rotavirus infection, some genes of the unfolded protein response (UPR), like grp78, become activated so that an increase of at least 4 times in the amount of this mRNA was observed in infected cells. In contrast, other UPR responsive genes, like grp94, did not increase during infection (30). To determine if these cellular mRNAs changed their distribution in the cell, we studied their distribution in nuclear and cellular fractions in virus-infected cells. We also characterized the distribution of the GAPDH mRNA, which is usually considered a transcript that does not vary significantly in rotavirus-infected cells. In these assays, MA104 cells were infected or mock infected and harvested at

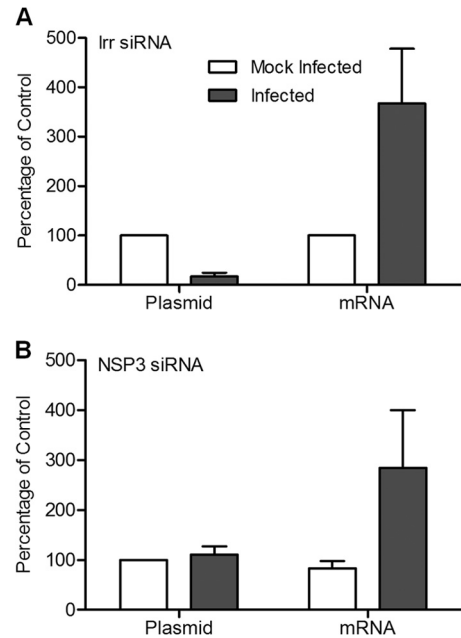


FIG 3 The translation of mRNAs transcribed in the nucleus is inhibited during rotavirus infection. MA104 cells were transfected either with an irrelevant (Irr) siRNA (A) or with an siRNA directed to NSP3 (B) and mock infected or infected with RRV at an MOI of 5. Plasmid pTK-Gluc or *in vitro* transcribed and polyadenylated Gluc mRNA was transfected into MA104 cells just after the virus adsorption period. Cells were harvested 12 hpi, and the *Gussia* luciferase activity was measured in the supernatant of the cell cultures and normalized to the amount of the Gluc mRNA present in the cell lysate under each condition, determined by qRT-PCR. The results are expressed as a percentage of the normalized Gluc activity obtained in mock-infected cells, which was taken as 100%. The arithmetic mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate is shown.

various times postinfection. The cytoplasmic and nuclear fractions were separated, and the relative amount of each mRNA was determined by qRT-PCR. We found that most of the grp78, grp94, and GAPDH mRNAs were present in the cytoplasmic fraction of mock-infected cells. However, when the grp78 and grp94 mRNAs were quantitated in infected cells at 6 and 12 hpi, we found that there was an increasing amount of the grp78 mRNA in the nuclear fraction and a decrease of the grp94 mRNA in the cytoplasmic fraction. This was not the case for the GAPDH mRNA, which seem to be more concentrated in the cytoplasm, although at 12 hpi there was a small increase, although not significant, in the amount of this mRNA in the nuclear fraction (Fig. 4). To establish whether the change in the cellular localization of the grp78 and grp94 mRNAs was due to rotavirus infection or if this was a generalized event for stressed cells, we characterized the localization of these mRNAs in cells that were treated with thapsigargin, a pharmacological inducer of endoplasmic reticulum (ER) stress. We found that thapsigargin caused an increase in the amount of both grp78 and grp94 mRNAs; however, in contrast with our observations in infected cells, these mRNAs were found mainly in the cytoplasmic fraction.

To determine if NSP3 was involved in the accumulation of the cellular mRNAs in the nuclei of infected cells, we silenced the expression of NSP3, measured the amounts of grp78, grp94, and GAPDH mRNAs by qRT-PCR in nuclear and cytoplasmic fractions, and compared them with their distribution in cells trans-

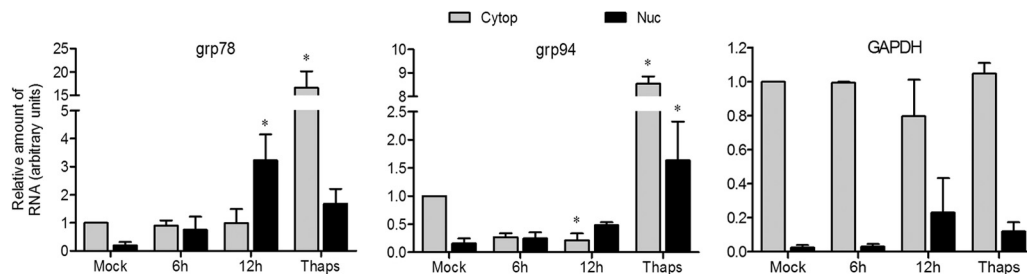


FIG 4 Nucleocytoplasmic distribution of cellular mRNAs in rotavirus-infected cells. MA104 cells were mock infected or infected with rotavirus RRV or were treated with 400 nM thapsigargin (Thaps) for 12 h. At the indicated times postinfection, cells were harvested, and nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cytop) fractions were obtained as described in Materials and Methods. Total RNA was extracted with TRIzol, and grp78, grp94, and GAPDH mRNAs were quantitated in each fraction by qRT-PCR. The qRT-PCR results are expressed as fold increases relative to the amount of each mRNA (grp78, grp94, or GAPDH) present in the cytoplasmic fraction of mock-infected cells, which was taken as 1. The arithmetic mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate is shown. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between treated cells and their mock counterparts, determined by ANOVA.

ected with an irrelevant siRNA. We found that when NSP3 was silenced, there was an increase in the amounts of grp78 and grp94 mRNAs, as previously observed (30); however, in this case the mRNAs appeared mostly in the cytoplasmic fraction, which was not the case when the cells were transfected with the irrelevant siRNA (Fig. 5). Taken together, these results suggest that during rotavirus infection, there is an accumulation of cellular mRNAs in the nucleus, in which NSP3 plays an important role, and that this differential mRNA distribution is not a general stress response of the cell.

Nuclear accumulation of PABPC induces the hyperadenylation of poly(A)-containing mRNAs. It has been recently found that the nuclear accumulation of PABPC in the nucleus causes the mRNAs to become hyperadenylated and retained in the nucleus (8). Since we found that during rotavirus infection, PABPC and poly(A)-containing mRNAs accumulate in the nucleus we determined if these cellular mRNAs were hyperadenylated. For this, we monitored the length of the grp78 mRNA by using a Northern blot assay. Cells were infected or not with rotavirus, and 12 hpi, total RNA was extracted and hybridized with oligo(dT) and treated with RNase H, and the products were separated by electrophoresis and probed with a 32 P-labeled grp78 DNA oligonucleotide. In rotavirus-infected cells, the length of the grp78 mRNA was extended in a heterogeneous manner compared to that of

mock-infected cells (Fig. 6A). This difference in size must be the result of hyperadenylation, since removal of the poly(A) tail hybridized to oligo(dT) by RNase H digestion resulted in the comigration of the grp78 mRNAs from infected and mock-infected cells. These results suggest that the mRNAs become hyperadenylated during the infection, most likely due to the relocalization of PABPC in the cell nucleus.

The cytoplasm of rotavirus-infected cells has a low abundance of poly(A)-containing mRNAs and contains a high level of viral mRNAs. Once we established that some cellular mRNAs were accumulating in the nuclei of infected cells, we explored if there was also a general decrease of polyadenylated mRNAs in the cytoplasm. For this, MA104 cells were infected or mock infected and harvested at 12 hpi, and the cytoplasmic and nuclear fractions were separated. Poly(A)-containing mRNAs were purified from each fraction by affinity chromatography, and their concentration was measured by spectrometry. We found that there was approximately 50% less poly(A)-containing mRNA in the cytosolic fraction of rotavirus-infected cells than in mock-infected cells (Fig. 6B), while the levels of polyadenylated mRNAs in the nucleus were very similar between infected and mock-infected cells. We also determined the relative abundances of viral mRNAs at different times postinfection. For this, the levels of mRNAs from rotavirus gene segments 6 and 10 were determined by qRT-PCR in

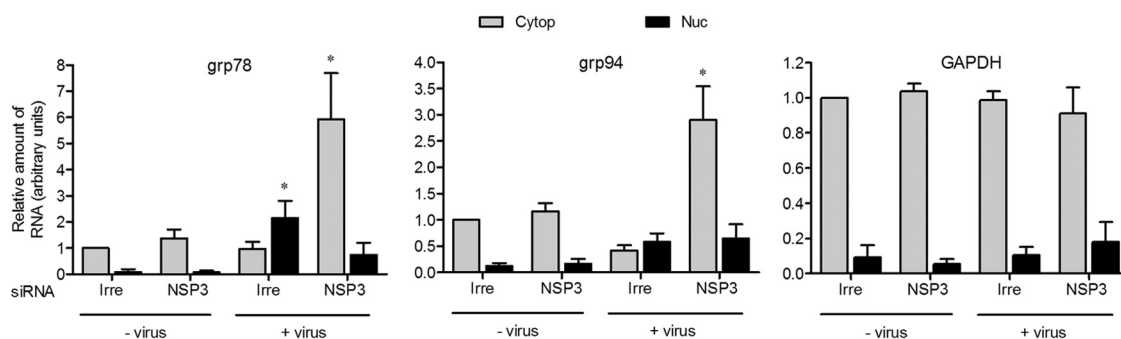


FIG 5 The viral protein NSP3 alters the nucleocytoplasmic distribution of cellular mRNAs in rotavirus-infected cells. MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs; 40 h posttransfection, cells were either infected (+virus) or mock infected (-virus), and 12 hpi, cells were harvested, and nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cytop) fractions were obtained as described in Materials and Methods. Total RNA was extracted with TRIzol, and grp78, grp94, and GAPDH mRNAs were quantitated in each fraction by qRT-PCR. The qRT-PCR results are expressed as a fold increase relative to the amount of each mRNA (grp78, grp94, or GAPDH) present in the cytoplasmic fraction of mock-infected cells, transfected with the control siRNA, which was taken as 1. The arithmetic mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate is shown. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between treated cells and their mock counterparts, determined by ANOVA.

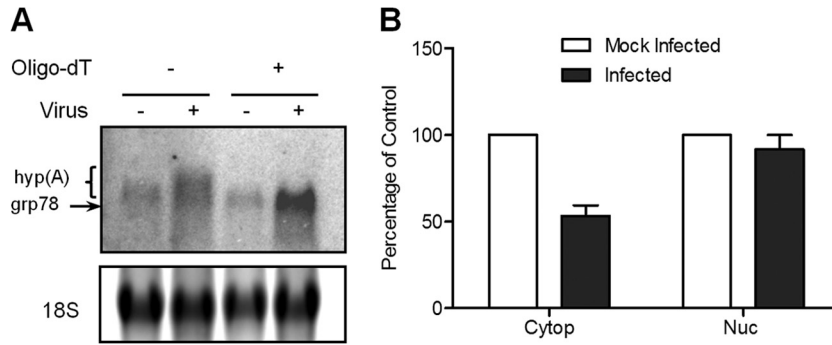


FIG 6 Cellular mRNAs become hyperadenylated, and the amount of poly(A)-containing mRNAs decreases in the cytoplasm of infected cells. (A) MA104 cells were infected or mock infected with rotavirus RRV, and at 12 hpi, the cells were lysed. Total RNA was extracted with TRIzol, hybridized or not with oligo(dT), and digested with RNase H as described in Materials and Methods. The digested products were resolved on a 0.8% agarose-formaldehyde gel, blotted, and hybridized to a ^{32}P -labeled grp78 probe. Hyperadenylated species are indicated by the open bracket [hyp(A) grp78]. The ribosomal 18S rRNA, which was stained with ethidium bromide, is shown as a loading control. (B) MA104 cells were mock infected or infected with rotavirus RRV, and at 12 hpi, total, nuclear, and cytoplasmic fractions were obtained as described in Materials and Methods. RNA was extracted with TRIzol, and poly(A)-containing mRNAs were purified by affinity chromatography using an Oligotex Direct mRNA minikit (Qiagen). The mRNA content of each fraction was determined by measuring the absorbance at 260 nm in an ND-1000 spectrophotometer. The amount of polyadenylated mRNAs in mock-infected cells was taken as 100%.

infected cells. As expected, we found that the amount of viral mRNAs increases during infection in such way that by 8 hpi, there are approximately 300,000 copies of the gene 10 mRNA per cell and about 100,000 copies/cell of gene 6. As controls, we measured the amounts of GAPDH mRNA and of 18S rRNA and found that there are approximately 1,500 and 3,800,000 copies/cell of these RNAs, respectively. These results indicate that during infection, the cytoplasmic pool of polyadenylated mRNAs decreases, while the virus transcribes a very large amount of viral mRNAs that can take advantage of the translation machinery of the cell.

DISCUSSION

The regulation of gene expression is exerted at various levels, ranging from the transcription of the mRNA in the nucleus to its processing, transport to the cytoplasm, and translation of the encoded protein. Viruses use several regulation strategies during translation but also in steps prior to it, which include the impairment of mRNA transport from the nucleus to the cytoplasm. For example, adenovirus and influenza virus selectively inhibit the export of host mRNAs to the cytoplasm. Interestingly, some RNA viruses, like poliovirus and vesicular stomatitis virus, which replicate exclusively in the cytoplasm, also induce the inhibition of nucleocytoplasmic trafficking (32–37). Several viruses target PABPC: poliovirus, calicivirus, hepatitis A virus, and HIV-1 and HIV-2 encode proteases that cleave it (38). Additionally, several other viruses change the subcellular localization of this protein; vaccinia virus, for instance, recruits PABPC to viral replication factories, where transcription and translation occur (39). Herpesvirus, bunyavirus, and rotavirus infections result in the accumulation of PABPC in the nucleus (19, 20, 40–43); however, the mechanism of nuclear retention in these cases has not been established yet, although viral proteins have been implicated.

Early during infection, rotavirus causes a shutoff of cell protein synthesis, with the nonstructural viral protein NSP3 playing a pivotal role in this process. NSP3 regulates the translation of cellular poly(A)-containing mRNAs by preventing their interaction with the eIF4F complex and also by changing the intracellular localization of PABPC, causing its accumulation in the nuclei of infected cells (15, 17–20). Interestingly, here we found that poly(A)-con-

taining mRNAs also accumulate in the nuclei of infected cells in an NSP3-dependent manner. The direct interaction of NSP3 with eIF4G and its involvement in the accumulation of PABPC and polyadenylated mRNAs in the cell nucleus clearly have a negative effect on the synthesis of cellular proteins.

The results obtained in this work suggest that besides a direct inhibitory translation mechanism or in addition to it, during rotavirus infection the translation of poly(A)-containing mRNAs is prevented by blocking their exit from the nucleus. This blockage is related to the presence of NSP3, but the direct mechanism by which this protein affects the nucleus-cytoplasm shuttling of PABPC and of poly(A)-containing mRNAs is not clear. NSP3 does not directly interact with PABPC (17), nor has it been observed in the cell nucleus. Silencing the expression of eIF4GI, eIF4GII, or both did not cause the accumulation of PABPC in the nucleus, suggesting that the eviction of PABPC from its binding site in eIF4G by NSP3 is not the main cause for the relocalization observed in rotavirus-infected cells. Harb et al. found that the interaction of NSP3 with RoXaN might be involved in the relocalization of PABPC (19). However, the direct mechanism by which PABPC is accumulated in the nucleus has not been described yet.

The existence of a translation enhancer in the 3' UTR of rotavirus mRNAs that consists of the terminal sequence 5'-GACC-3' was previously reported (44). These observations were obtained by transfecting rotavirus-infected cells with chimeric mRNAs containing the firefly luciferase ORF flanked either by the 5' and 3' UTRs from rotavirus SA11 gene 6 or by nonviral mRNA UTRs (44). In contrast, in this work we compared the translation of chimeric luciferase reporters containing the 5' and 3' ends of a viral gene versus a chimeric reporter gene containing the UTRs of a cellular gene, including a poly(A) tail. Our results indicate that the UTRs of rotavirus did not give a translational advantage over the UTRs of a cellular mRNA, since the translation of a "viral-like" reporter mRNA was not significantly better than that of a "cellular-like" reporter, even in infected cells. These results suggest that rotavirus mRNAs are preferentially translated over host mRNAs through a mechanism that appears to be independent from *cis*-acting sequences that could be present in their UTRs. Instead, we observed that if the mRNAs were delivered in the cytoplasm of

infected cells, the mRNAs (either viral or cellular) were more efficiently translated than when transfected before viral infection. The increased translation under these conditions of a reporter mRNA with cellular UTRs and a poly(A) tail indicates that mRNAs delivered into the cytoplasm of infected cells are resistant to rotavirus-induced protein synthesis shutoff. With these experiments, however, we cannot rule out the possibility that regions within the viral ORFs might contribute to the translation efficiency of viral mRNAs.

These observations were extended by comparing the translation of a Gluc reporter mRNA delivered into the cell either as a plasmid that needed to be transcribed in the cell nucleus, exported, and then translated versus the same Gluc reporter which was transfected into the cells as a polyadenylated mRNA. The results obtained in these experiments indicate that in rotavirus-infected cells, the translation seems to be regulated mainly by the nucleocytoplasmic transport of mRNAs, indirectly controlled by NSP3; the resistance of the Gluc reporter mRNA to rotavirus-induced shutoff of protein synthesis when transfected after virus infection also confirms that the efficient translation of rotavirus mRNAs is not sequence dependent. These results were further confirmed by analyzing the expression and subcellular localization of three cellular polyadenylated mRNAs (GAPDH, *gpr78*, and *gpr94*) in rotavirus-infected cells. Altogether, these results show that during rotavirus infection, there is a retention of poly(A)-containing mRNAs in the nucleus, with a concomitant reduction in the cytoplasm, that makes them spatially unavailable to be translated.

PABPC is a nucleocytoplasmic shuttling protein (45), although its steady-state localization is cytoplasmic. It was recently reported that increasing the nuclear abundance of PABPC drives hyperadenylation and nuclear retention of mRNAs, thereby inhibiting their expression (8). Interestingly, these authors demonstrated that several divergent viral proteins that inhibit host translation induce the nuclear accumulation of PABP and the hyperadenylation of transcripts in the nucleus (8); furthermore, besides viral infection, other types of stress, like heat shock or oxidative stress, also cause the same phenotype, and thus it has been proposed that controlling the localization of PABPC might be a novel mechanism to globally regulate gene expression (46). Here we also found that during rotavirus infection, host mRNAs became hyperadenylated and retained in the nucleus, most likely due to the nuclear accumulation of PABPC. Since rotavirus mRNAs are transcribed in the cytoplasm, the nuclear accumulation of poly(A)-containing mRNAs would be an effective means to selectively block nascent cellular gene expression, suppressing cellular antiviral responses and avoiding competition for the cell protein synthesis machinery.

In addition to preventing the exit of poly(A)-containing mRNAs from the cell nucleus, the virus transcription machinery directs the synthesis of large amounts of viral mRNAs. We found that the amount of viral mRNAs is in the range of tens of thousands of molecules per cell, which is about 100 times higher than the amount of a typical cellular mRNA (GAPDH) and about 10 times lower than the amount of the 18S rRNA; this large number of mRNAs (of very low complexity, since they represent only 11 different mRNAs) in a cell where the translation of poly(A)-containing mRNAs is inhibited by at least three different mechanisms [eIF2 α phosphorylation, NSP3 evicting PABPC from eIF4G, and poly(A) mRNAs retained in the nucleus] leaves the translation of

viral mRNAs with little or no competition for the protein synthesis machinery and explains the severe shutoff host translation caused by rotaviruses. Indeed, the amount of viral mRNAs produced in an infected cell is so large that we have observed that silencing the expression of the RNA polymerase VP1 or the guanylyl-transferase (VP3) by RNAi results in a decrease of about 90% in the amount of viral mRNAs in the infected cell, yet the amount of viral protein synthesized under these conditions is not decreased, implying that 10% of the viral mRNAs is sufficient to direct the synthesis of all the viral protein needed during the replication cycle of the virus (28).

In summary, our results show that the regulation of gene expression in cells infected with rotavirus seems to be a multifactorial process. At early times of infection, there is an alteration in the host translation machinery in which eIF2 α becomes phosphorylated and NSP3 evicts PABPC from its binding site in eIF4G in such way that the viral mRNAs are preferentially translated. As the infection proceeds, PABPC is relocalized to the cell nucleus, and the newly transcribed cellular mRNAs become hyperadenylated and are accumulated in the cell nucleus, unable to reach the cytoplasm, making them spatially unavailable for translation. While the population of cellular mRNAs decreases in the cytoplasm during infection, the viral mRNAs are transcribed in the cytoplasm at a high rate, resulting in highly favorable conditions for the translation of viral over cellular mRNAs. At the same time, by preventing the translation of cellular genes, the virus controls the antiviral and stress responses of the host. How cytoplasmic mRNAs can be efficiently translated even though eIF2 α is phosphorylated during the infection remains to be answered.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to C. Ayala for the FISH experiments, E. Lopez and P. Gaytan for oligonucleotide synthesis, and J. Yañez for DNA sequencing. We thank N. Sonenberg for the anti-eIF4GII antibody and O. Pantoja for the donation of plasmid pOO2.

This work was supported by grants IN211411-3 from DGAPA/UNAM and 153639 from CONACyT. R.M.R. is a recipient of a scholarship from CONACyT.

REFERENCES

1. Dever TE. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108:545–556.
2. Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A. 2008. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453:1276–1280.
3. Kahvejian A, Roy G, Sonenberg N. 2001. The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 66:293–300.
4. Hershey JWB, Merrick WC. 2000. The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, p 33–88. *In* Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB (ed), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
5. Kozak M. 1989. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.* 9:5073–5080.
6. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:7029–7036.
7. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4:223. doi:10.1186/gb-2003-4-7-223.
8. Kumar GR, Glaunsinger BA. 2010. Nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 30:4996–5008.
9. Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK, Dreyfuss G. 1986.

- mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* 6:2932–2943.
10. de Melo Neto OP, Standart N, Martins de Sa C. 1995. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23:2198–2205.
 11. Madrid AS, Weis K. 2006. Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* 115:98–109.
 12. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565–572.
 13. Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses, p 1917–1974. *In* Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), *Fields virology*, 5th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
 14. Poncet D, Aponte C, Cohen J. 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J. Virol.* 67:3159–3165.
 15. Groft CM, Burley SK. 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* 9:1273–1283.
 16. Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D. 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* 73:5411–5421.
 17. Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17:5811–5821.
 18. Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 74:7064–7071.
 19. Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, Brown SC, Bolte S, Arold ST, Poncet D. 2008. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.* 82:11283–11293.
 20. Montero H, Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82:1496–1504.
 21. Montero H, Arias CF, Lopez S. 2006. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 80:9031–9038.
 22. Arnold MM, Brownback CS, Taraporewala ZF, Patton JT. 2012. Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly-A binding protein. *J. Gen. Virol.* 93:1483–1494.
 23. Pando V, Isa P, Arias CF, Lopez S. 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295:190–200.
 24. Gonzalez RA, Torres-Vega MA, Lopez S, Arias CF. 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* 143:981–996.
 25. Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, Lopez S. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79:184–192.
 26. Mingle LA, Okuhama NN, Shi J, Singer RH, Condeelis J, Liu G. 2005. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell Sci.* 118:2425–2433.
 27. Gutierrez M, Isa P, Sanchez-San Martin C, Perez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, Lopez S. 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 84:9161–9169.
 28. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, Lopez S. 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J. Virol.* 83:8819–8831.
 29. Maruri-Avidal L, Lopez S, Arias CF. 2008. Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J. Virol.* 82:5368–5380.
 30. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, Lopez S. 2011. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* 85:12594–12604.
 31. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method. *Methods* 25:402–408.
 32. Castello A, Izquierdo JM, Welnowska E, Carrasco L. 2009. RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage. *J. Cell Sci.* 122:3799–3809.
 33. Faria PA, Chakraborty P, Levay A, Barber GN, Ezelle HJ, Enninga J, Arana C, van Deursen J, Fontoura BM. 2005. VSV disrupts the Rael/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Mol. Cell* 17:93–102.
 34. Gustin KE, Sarnow P. 2001. Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J.* 20:240–249.
 35. Her LS, Lund E, Dahlberg JE. 1997. Inhibition of Ran guanosine triphosphate-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 276:1845–1848.
 36. Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzveig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM. 2007. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:1853–1858.
 37. Beltz GA, Flint SJ. 1979. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J. Mol. Biol.* 131:353–373.
 38. Smith RW, Gray NK. 2010. Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem. J.* 426:1–12.
 39. Walsh D, Arias C, Perez C, Halladin D, Escandon M, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Mohr I. 2008. Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol. Cell. Biol.* 28:2648–2658.
 40. Blakqori G, van Knippenberg I, Elliott RM. 2009. Bunyamwera orthobunyavirus S-segment untranslated regions mediate poly(A) tail-independent translation. *J. Virol.* 83:3637–3646.
 41. Lee YJ, Glaunsinger BA. 2009. Aberrant herpesvirus-induced polyadenylation correlates with cellular messenger RNA destruction. *PLoS Biol.* 7:e1000107. doi:10.1371/journal.pbio.1000107.
 42. Richner JM, Clyde K, Pezda AC, Cheng BY, Wang T, Kumar GR, Covarrubias S, Coscoy L, Glaunsinger B. Global mRNA degradation during lytic gammaherpesvirus infection contributes to establishment of viral latency. *PLoS Pathog.* 7:e1002150. doi:10.1371/journal.ppat.1002150.
 43. Salaun C, MacDonald AI, Larralde O, Howard L, Lochtie K, Burgess HM, Brook M, Malik P, Gray NK, Graham SV. 2010. Poly(A)-binding protein 1 partially relocates to the nucleus during herpes simplex virus type 1 infection in an ICP27-independent manner and does not inhibit virus replication. *J. Virol.* 84:8539–8548.
 44. Chizhikov V, Patton JT. 2000. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA* 6:814–825.
 45. Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 273:13015–13021.
 46. Kumar GR, Shum L, Glaunsinger BA. 2011. Importin alpha-mediated nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein occurs as a direct consequence of cytoplasmic mRNA depletion. *Mol. Cell. Biol.* 31:3113–3125.