



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE MODULAN
LA VÍA 2'5-OLIGOADENILATO SINTETASA/RNasa L DURANTE LA INFECCIÓN
POR ROTAVIRUS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

LILIANA SÁNCHEZ TACUBA

Tutora Principal:

DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN
[Instituto de Biotecnología. UNAM](#)

Miembros del comité tutor:

Dr. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA CONDE
[Centro de Investigación en Dinámica Celular. UAEM](#)

Dr. JUAN MIRANDA RÍOS
[Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Enero 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 se realizó 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, con apoyo del donativo PAPIIT DGAPA, proyecto IG200317. La alumna contó con una beca otorgada por el CONACYT y con el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) para la asistencia a congresos y estancias.

Comité tutor:

Dra. Susana López Charretón

Dr. Juan Miranda Ríos

Dr. Ramón González García Conde

Jurado de examen de grado:

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

Dr. Ernesto Ortiz Suri

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Siglas, abreviaturas y acrónimos

2'5-A	2'5-oligoadenilatos
aa	Aminoácido
AS	Ácidos síalicos
CME	Criomicroscopía electrónica
DLP	Partícula de rotavirus de doble capa (Double-Layered Particle)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena (double-stranded RNA)
EGTA	Ácido etilenglicol tetra acético (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid)
hpi	horas post infección
Hsc70	Proteína constitutiva de estrés calórico (70-kDa Heat shock cognate protein)
HSV-1	Virus herpes simple tipo 1 (Herpes Simplex Virus type 1)
MDA5	Proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5)
IR	Intermediario de Replicación
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferones
MEM	Medio mínimo esencial (Minimal Essential Medium)
MHV	Virus de la hepatitis murina (Mouse Hepatitis Virus)
MOI	Multiplicidad de infección (Multiplicity Of Infection)
NA	Neuroaminidasa
Nar3	Rotavirus variante de RRV resistente a la neuraminidasa, clona 3
NSP	Proteína no estructural (Non-Structural Protein)
OAS	Oligoadenilato sintetasa (2'-5'-Oligoadenylate synthase)
PBS	Amortiguador fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
PKR	Proteína cinasa activada por RNA de doble cadena (Protein Kinase dsRNA-activated)
PDE	Fosfodiesterasa
r-Nar3-14	Rotavirus revertante de Nar3, clona 14
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RIG-I	Proteína del gen inducible por ácido retinóico I (Retinoic acid-Inducible Gene I protein)
RLR	Receptor tipo RIG-I (RIG-I-Like Receptor)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RNAi	Interferencia de RNA
RNasa L	Ribonucleasa latente
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal (ribosomal RNA)
RRV	Rotavirus de simio "Rhesus rotavirus"
RVs	Rotavirus
SFB	Suero Fetal Bovino

siRNA	Pequeños RNAs interferentes (s mall i nterfering RNA)
SIPs	Spikeless
TA	T emperatura A mbiente
TLPs	Partículas de rotavirus de triple capa (T riple- L ayered P article)
UK	Rotavirus bovino UK
Vim	Vimentina
VP	Proteína viral (V iral P rotein)
Wa	Rotavirus cepa humana Wa
WB	Western blot
YM	Rotavirus cepa porcina YM

ÍNDICE

Siglas, abreviaturas y acrónimos	0
ÍNDICE	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Los rotavirus	4
1.1.1 <i>Importancia epidemiológica de las infecciones causadas por rotavirus</i>	4
1.1.2 <i>Generalidades de los rotavirus</i>	4
1.1.3 <i>Estructura de los rotavirus</i>	5
1.1.4 <i>Ciclo replicativo</i>	7
1.1.5 <i>Eventos iniciales durante la infección</i>	8
1.2 Inmunidad innata contra de las infecciones virales	13
1.2.2 <i>Respuesta mediada por los Interferones (IFN)</i>	13
1.2.3 <i>La vía 2'5-Oligoadenilato Sintetasa/Ribonucleasa L (OAS/RNasa L)</i>	17
II. ANTECEDENTES	21
2.1 Los rotavirus modulan la respuesta mediada por los interferones tipo I	21
2.2 Los virus modulan la vía antiviral OAS/RNasa L.....	25
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVOS	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	30
VI. RESULTADOS	41
6.1 La vía antiviral OAS/RNasa L restringe la infección por los rotavirus de la cepa RRV	41
6.2 Durante la infección con RRV no hay degradación de los RNAs ribosomales.....	42
6.3 La infección con RRV previene la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA y los 2'5-A. 43	
6.4 La distribución y la cantidad de las proteínas OAS y RNasa L no se modifican durante la infección con RRV	45
6.5 La cantidad del inhibidor de la RNasa L no se modifica durante la infección con RRV.....	47
6.6 Las proteínas de la capa externa VP4 y/o VP7 están involucradas en la modulación de la vía OAS/RNasa L	49
6.7 El componente viral que modula la vía OAS/RNasa L forma parte de la partícula viral, pero es requerida la transcripción viral para un control eficiente	51
6.8 La proteína VP4 está implicada en la modulación de la vía OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección.....	53
6.9 Durante las primeras etapas del ciclo infeccioso los rotavirus toman el control de la vía OAS/RNasa L	59
6.9.1 <i>Ensayos con neuraminidasa</i>	59
6.9.2 <i>Ensayos con anticuerpos neutralizantes</i>	60
6.9.3 <i>Ensayos con rotavirus que tienen diferentes requerimientos de receptores</i>	64

6.10 La proteína VP3 está involucrada en la modulación del complejo OAS/RNasa L	68
6.11 Relevancia del papel antagónico de la VP3 sobre la vía OAS/RNasa L en el ciclo infeccioso de RRV	73
6.12 Caracterización de las partículas ensambladas en presencia de los siRNAs VP3/RNasa L	76
6.13 La disminución de la proteína RNasa L tienen efecto en la producción de partículas virales infecciosas	79
VII. DISCUSIÓN	85
VIII. CONCLUSIONES	89
IX. PERSPECTIVAS	90
REFERENCIAS.....	91
ANEXO I.....	97
ANEXO II.....	107
ANEXO III.....	110

Índice de Figuras

Figura 1.0: Estructura de la partícula viral de rotavirus y los patrones electroforéticos de su genoma viral y proteínas.....	5
Figura 1.1: Ciclo replicativo de los rotavirus.....	8
Figura 1.2: Esquema de la proteína VP4.....	9
Figura 1.3: Esquema de la proteína VP7.....	11
Figura 1.4: Respuesta de IFN.....	16
Figura 1.5: Vía 2'5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L activada por el dsRNA.....	18
Figura 1.6: Estructura química de los 2'5-Oligoadenilatos	19
Figura 2.0: Esquema de organización de los dominios de la proteína VP3	24
Figura 2.1: Interacciones moleculares entre el DTC de la VP3 de los RVA con los 2'5-A.	25
Figura 5.0: Análisis representativo de la cuantificación de los productos de corte de la RNasa L.....	40
Figura 6.0: Efecto de la ausencia de las proteínas RNasa L, OAS1 y OAS3 en la infectividad y producción de partículas virales infecciosas	41
Figura 6.1: Durante la infección con RRV no hay degradación de los rRNAs.....	43
Figura 6.2: La infección con RRV previene la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA y los 2-5 A.....	44
Figura 6.3: Localización celular de la RNasa L y OAS1	46
Figura 6.4: Localización del IRL.....	48
Figura 6.5: Expresión del IRL	48
Figura 6.6: Efecto de la infección con DLPs y TLPs sobre la degradación de los rRNAs.	50
Figura 6.7: Efecto de la infección de RRV inactivado sobre la integridad de los rRNAs.....	52
Figura 6.8: Gradientes isopícnicos de CsCl de las partículas virales de RRV ensambladas en ausencia o presencia del siRNA dirigido a la VP4 de RRV.....	54
Figura 6.9: Perfil proteico de las bandas correspondientes a las TLPs, DLPs y Spikeless obtenidas por gradientes isopícnicos de CsCl, desaladas y teñidas con plata	55
Figura 6.10: Evaluación de la infectividad de las Spikeless.	56
Figura 6.11: Efecto de la infección con SIPs sobre la integridad de los rRNAs	57

Figura 6.12: Efecto de la infección con TLPs, DLPs y SIPs sobre la integridad de los rRNAs	58
Figura 6.13: Primeros pasos en la infección de los rotavirus de la cepa RRV	59
Figura 6.14: Efecto de los anticuerpos neutralizantes sobre el control de la vía OAS/RNasa L por RRV.....	62
Figura 6.15: Efecto de la infección con diferentes cepas de rotavirus sobre la degradación de los rRNAs.....	64
Figura 6.16: Efecto de la infección con la r-Nar3 sobre la integridad de los rRNAs	66
Figura 6.17: Efecto de la infección con la rearreglante 19-1-1 sobre la integridad de los rRNAs	67
Figura 6.18: Efecto de la ausencia de las proteínas virales estructurales en la modulación de la vía OAS/RNasa L	69
Figura 6.19: Efecto de la ausencia de las proteínas virales no estructurales en la modulación del complejo OAS/RNasa L.....	70
Figura 6.20: Efecto del silenciamiento de VP3 en la modulación de la vía OAS/RNasa L.....	72
Figura 6.21: Rendimiento viral de RRV en presencia de los siRNAs dirigidos contra las proteínas virales VP1 y VP3, solos o en combinación con los siRNAs dirigidos a la RNasa L.....	74
Figura 6.22: Efecto del silenciamiento de la expresión de las proteínas VP1 y VP3, solas o en combinación con la RNasa L en la estabilidad de los transcritos virales	75
Figura 6.23: Perfil proteico de las partículas virales de RRV ensambladas en ausencia o presencia de los siRNAs VP1, VP3, RNasa L.....	77
Figura 6.24: Infectividad de las partículas virales ensambladas en presencia del siRNA VP3, solo o en combinación con el siRNA RNasa L	78
Figura 6.25: Efecto de la ausencia de la proteína RNasa L en la producción de partículas virales infecciosas.....	79
Figura 6.26: Efecto de la ausencia de VP3 sobre la infectividad y producción de partículas virales infecciosas....	80
Figura 6.27: Rendimiento viral de UK en presencia de los siRNAs dirigidos contra las proteínas virales VP1 y VP3, solos o en combinación con los siRNAs dirigidos a la RNasa L.....	81
Figura 6.28: Síntesis de novo de proteínas celulares y virales en células infectadas con los rotavirus de las cepas UK y RRV.....	83
Figura 6.29: Ensayos tipo western blot para determinar la cantidad total de proteína viral producida durante la infección de los rotavirus de las cepas UK y RRV.....	84
Figura 7.0: Comparación de la secuencia de aminoácidos del extremo carbonilo terminal de la proteína VP3 de las cepas UK y RRV.....	88

RESUMEN

La vía antiviral 2'5-OAS/RNasa L es uno de los mecanismos más potentes con los que cuentan la gran mayoría de las células de mamíferos para hacer frente a las infecciones virales. La actividad de esta vía consiste en la síntesis de los 2'5-oligoadenilatos (2'5-A); cadenas cortas de adenosinas sintetizadas por las oligoadenilato sintetasas (OAS) en respuesta a la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA) en el citoplasma celular. Los 2'5-A funcionan como segundos mensajeros que activan a la RNasa L; la enzima ejecutora de esta vía antiviral. Una vez activa, la RNasa L es capaz de limitar la replicación de virus de RNA y DNA por diversos mecanismos. Se ha descrito que muchos virus han desarrollado estrategias para contender con los efectos antivirales de dicha vía, lo cual evidencia su importante papel en el control de las infecciones virales.

En este trabajo, caracterizamos la relevancia de esta vía antiviral en el contexto de la infección por los rotavirus, empleando como modelo de estudio la línea celular MA104 y el rotavirus de simio RRV. Al silenciar la expresión de las proteínas antivirales OAS y RNasa L mediante ensayos de RNA de interferencia (RNAi), encontramos que la producción de progenie viral aumentó, evidenciando el papel antiviral de dicha vía. No obstante, observamos que la infección con RRV es capaz de suprimir la activación de la RNasa L inducida por el dsRNA y los 2'5-A, lo cual demostró la capacidad de los rotavirus para modular la vía OAS/RNasa L.

Para caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en este control, evaluamos el efecto de la infección con DLPs y TLPs en el control de dicha vía. Estos ensayos sugirieron que las proteínas de la capa externa, VP4 o VP7, están involucradas en la modulación del complejo antiviral durante o como consecuencia del proceso de entrada, evidenciando que la partícula viral es capaz de controlar dicha vía desde las primeras interacciones con su célula huésped. Adicionalmente, todos estos ensayos también indicaron que, si bien la partícula viral es capaz de mediar la inhibición de esta vía antiviral desde las primeras interacciones del virus con su célula hospedera, se requiere además de la síntesis *de novo* de un componente viral para que los rotavirus de la cepa RRV puedan mantener el control de la vía OAS/RNasa L.

Al silenciar cada una de las proteínas virales encontramos que la proteína estructural 3 (VP3), también está involucrada en este control. Recientemente, se demostró que VP3 tiene actividad de fosfodiesterasa y en este trabajo mostramos que dicha actividad es la responsable de prevenir la activación de la RNasa L, al degradar a sus activadores; los 2'5-A. Al caracterizar la relevancia de la actividad de PDE de VP3 durante el ciclo infeccioso, encontramos que esta actividad en el control del complejo OAS/RNasa L es de suma importancia, incluso de mayor relevancia que su actividad como guanilil-metil-transferasa para la producción de la progenie viral.

ABSTRACT

The 2'5-oligoadenylate (2'5-A) synthetase (OAS)/Ribonuclease (RNase) L pathway is a powerful immune mechanism to control viral infection on mammalian cells. When activated by dsRNA, OAS use ATP to synthesize 5'-triphosphorylated 2'5-A. Trimeric and longer species of 2'5-A bind with high specificity and affinity to the inactive monomeric RNase L, causing it to dimerize and become active. This RNase L dimer cleaves single-stranded regions of both viral and cellular messenger RNA (mRNA), leading to inhibition of viral replication and protein synthesis while enhancing type I IFN induction. The antiviral activity of the OAS-RNase L pathway has been demonstrated during infection of numerous RNA and DNA viruses. Not surprisingly, viruses have evolved multiple mechanisms to antagonize or prevent activation of RNase L.

In this work, we studied the relevance of the OAS/RNase L pathway during rotavirus infection using MA104 cells and Rhesus rotavirus strain as a model. When we silenced the expression of OAS and RNase L by RNA interference (RNAi), the yield of infectious virus increased, suggesting that this pathway has a deleterious effect on rotavirus infections. Nevertheless, we could not find RNase L activity in rotavirus-infected cells. Interestingly, we observed that RRV infection prevents RNase L activation induced by dsRNA or 2'5-A. These results suggested that the virus is capable of antagonizing the OAS/RNase L pathway. To characterize the mechanism through which rotavirus controls the OAS/RNase L pathway, we studied if the entry of the virus had a role in the control of the pathway. To achieve this, we

evaluated the infection with TLPs, DLPs or iRRV and their capacity to avoid the RNase L activation induced by dsRNA. These results suggested that the entry of viral particles triggers a signal that prevents the initial degradation of rRNA, and later on, the virus has a second mechanism, which depends on the de novo synthesis of a viral component, to keep RNase L inactive. To identify the second viral component, we silenced the expression of each viral protein using RNAi, and the effect of the absence of each viral protein on rRNA stability was determined. We found that the knockdown of VP3 was the only treatment that caused degradation of rRNAs.

Until recently, the functions attributed to VP3 were its activity as a guanylyltransferase and as a methyltransferase responsible for the 5'capping and the 2'O-methylation of the 5'cap structures of viral transcripts. Recently, it was found, that the carboxyterminal domain (CTD) of certain rotavirus VP3 has a 2'5'-phosphodiesterase (PDE) activity. This particular phosphodiesterase cleaves the 2'5'-phosphodiester bond of the 2'5-A, antagonizing the OAS/RNase L pathway.

To determine the relevance of the phosphodiesterase activity of VP3 compared with its capping function during virus replication, we silenced the expression of VP3 and RNase L simultaneously by RNAi, with the rationale that in the absence of RNase L we could evaluate the relevance of the guanylyltransferase and methyltransferase functions of this protein in the replication cycle of the virus. Cosilencing the expression of VP3 and RNase L in infected cells resulted in yields of viral infectious particles at levels similar to those obtained in control infected cells, where no genes were silenced, suggesting that the capping activity of VP3 is not essential for the formation of infectious viral particles.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Los rotavirus

1.1.1 Importancia epidemiológica de las infecciones causadas por rotavirus

De acuerdo al último reporte de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años, representando un serio problema de salud pública a nivel mundial. (<http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/>) Se han identificado a los rotavirus como el principal agente etiológico de dichas enfermedades. La infección por rotavirus es la responsable de alrededor de 200 000 muertes anuales, primordialmente en países en vías de desarrollo, pese a la introducción de dos vacunas seguras y efectivas. La tasa de incidencia de la infección por rotavirus es similar en los países en vías de desarrollo y en los desarrollados, en donde ni la calidad del suministro de agua ni las condiciones higiénicas y sanitarias han tenido un impacto positivo en el control de la infección; sin embargo, en los países más pobres la tasa de mortalidad es mayor, como consecuencia de la desnutrición y de las dificultades para acceder oportunamente a los servicios de salud (1-3). Los rotavirus presentan también un importante problema económico y veterinario, puesto que infectan a una gran cantidad de mamíferos de interés económico (4).

1.1.2 Generalidades de los rotavirus

Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores al estudiar por microscopía electrónica biopsias del intestino delgado de niños que presentaron diarrea de causa desconocida. Posteriormente, se propuso el nombre de rotavirus (del latín *rota* “rueda”) con base en su morfología y se les incluyó en la familia *Reoviridae* (5).

Los rotavirus están divididos inmunológicamente en siete serogrupos, del A al G. El serogrupo A es el más importante epidemiológicamente y por tanto es el que más se ha estudiado; este serogrupo está a su vez subdividido en diferente serotipos y genotipos, clasificación basada

en las proteínas que forman la capa externa del virus, las cuales serán descritas en la siguiente sección (5).

1.1.3 Estructura de los rotavirus

Los rotavirus son virus no envueltos, cuya partícula infecciosa con un diámetro de 75-100 nm está formada por tres capas concéntricas de proteínas que rodean el genoma viral, constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), los cuales codifican para seis proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 (VP; *Viral Protein*) así como para seis proteínas no estructurales: NSP1-NSP6 (NSP; *Non Structural Protein*). Debido a la variedad del tamaño de los genes y las proteínas de los rotavirus, es posible obtener un patrón electroforético característico del genoma viral, así como de sus proteínas, ver Figura 1.0 (5, 6).

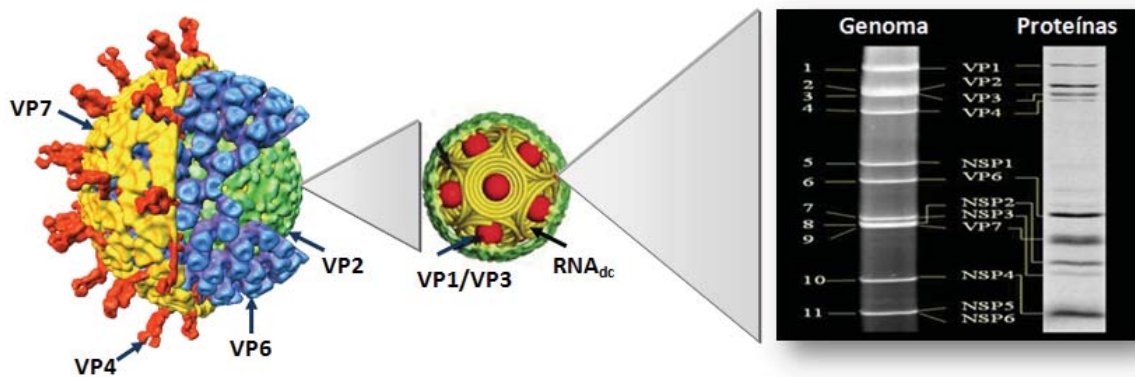


Figura 1.0: Estructura de la partícula viral de rotavirus y los patrones electroforéticos de su genoma viral así como de sus proteínas. Modificada de (7, 8).

El genoma viral de los rotavirus se encuentra rodeado por la nucleocápside, la cual está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2 y por pequeñas cantidades de las proteínas VP1 y VP3. A su vez, la nucleocápside se encuentra rodeada por una capa intermedia compuesta por 260 trímeros de VP6; a las partículas de dos capas se les conoce como DLPs (*Double Layered Particles*) que tienen la actividad de transcriptasa. La capa externa está compuesta por 780 moléculas de VP7 y de esta capa se proyectan 60 espículas formadas por trímeros de VP4. La partícula de tres capas conocida como TLP (*Triple Layered Particle*)

constituye la partícula infecciosa (5, 9). Las proteínas no estructurales de los rotavirus tienen diversas funciones durante la replicación, la morfogénesis del virus y el control de la respuesta antiviral de la célula. Algunas de las características de las proteínas virales se resumen en la Tabla 1.0.

Tabla 1.0: Características de los genes y proteínas de los rotavirus. Adaptada de (5-7).

Gene	Tamaño (pb)	Proteína	Masa Molecular (KDa)	Función y propiedades de la proteína
1	3302	VP1	125	<i>RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp)</i> Existen 12 copias de VP1 en la partícula viral. Se une al dsRNA e interacciona con VP2 y VP3.
2	2687	VP2	94	<i>Componente estructural de la nucleocápside</i> Existen 120 copias de VP2, es una proteína que se une al dsRNA. Su presencia es requerida para la actividad de la RdRp.
3	2592	VP3	88	<i>Enzima con actividad de guanilil-metil transferasa Y fosfodiesterasa</i> Existen 12 copias de VP3, es una proteína de unión al RNA de cadena sencilla, forma complejos con VP1.
4	2362	VP4	86	<i>Actividad de hemaglutinina</i> Existen 180 copias de VP4, es una proteína importante en la interacción con los receptores de la célula huésped y en la penetración del virus. Constituye las espículas de las TLPs.
5	1611	NSP1	59	<i>Antagonista de respuestas celulares antivirales</i> Implicada en la modulación de la respuesta mediada por los interferones.
6	1356	VP6	45	<i>Componente estructural de la capa intermedia</i> Con 780 copias asociadas en 260 trímeros por partícula viral. Es una proteína altamente hidrofóbica.
7	1104	NSP3	37	<i>Regulador de la traducción de los mRNA virales</i> Proteína de unión al dsRNA, interactúa con eIF4G en el mismo lugar que PABP.
8	1059	NSP2	35	<i>Componente estructural de los viroplasmos</i> Importante en la replicación y empaquetamiento del genoma viral, tiene actividad de NTPasa.
9	1062	VP7	37	<i>Componente estructural de la capa externa</i> Con 780 copias asociados en 260 trímeros por partícula viral. Proteína de unión a calcio.
10	751	NSP4	20	<i>Enterotoxina viral</i> Glicoproteína que se asocia al retículo endoplásmico, importante en los procesos de morfogénesis.
11	667	NSP5	26	<i>Componentes estructurales de los viroplasmos</i> Interactúa con NSP2, proteína de unión al RNA y con actividad de cinasa.
		NSP6	11	

1.1.4 Ciclo replicativo

Los rotavirus tienen un alto tropismo por los enterocitos maduros presentes en las vellosidades del intestino delgado. Estos virus infectan varias líneas celulares de origen epitelial de riñón y de intestino (5, 9). También presentan un rango de hospedero definido, lo que se evidencia cuando RVs aislados de cierta especie animal disminuyen su virulencia y capacidad de replicación en especies heterólogas. Se ha sugerido que las bases que restringen el rango de hospedero de los RVs son multifactoriales; se ha reportado que los principales determinantes del rango de huésped son las proteínas virales VP4 y NSP1 (10, 11).

El ciclo replicativo de los rotavirus se resume en la Figura 1.1. Éste inicia cuando la partícula viral se une a sus receptores presentes en la membrana celular (1) y posteriormente es internalizada por endocitosis (2). Dentro de la célula, la partícula viral pierde su capa más externa quedando como una DLP; que inicia la transcripción de los 11 segmentos de RNA, que codifican para las 12 proteínas virales (3,4). Una vez que se acumula una cantidad crítica de proteínas virales, los mensajeros virales sirven como moldes para la síntesis del RNA genómico, proceso llevado a cabo en los intermediarios de replicación dentro de los viroplasmos, que son gránulos macromoleculares compuestos de proteínas virales, RNA viral y algunas proteínas celulares. En los viroplasmos, los intermediarios de replicación dan origen a las partículas de una sola capa y de dos capas (6-8), las cuales posteriormente migran al retículo endoplásmico rugoso (RER) (9), en donde se completa el ensamble de la partícula madura, la TLP, que puede ser liberada de manera dependiente o no dependiente de la lisis celular (10) (5-9, 12).

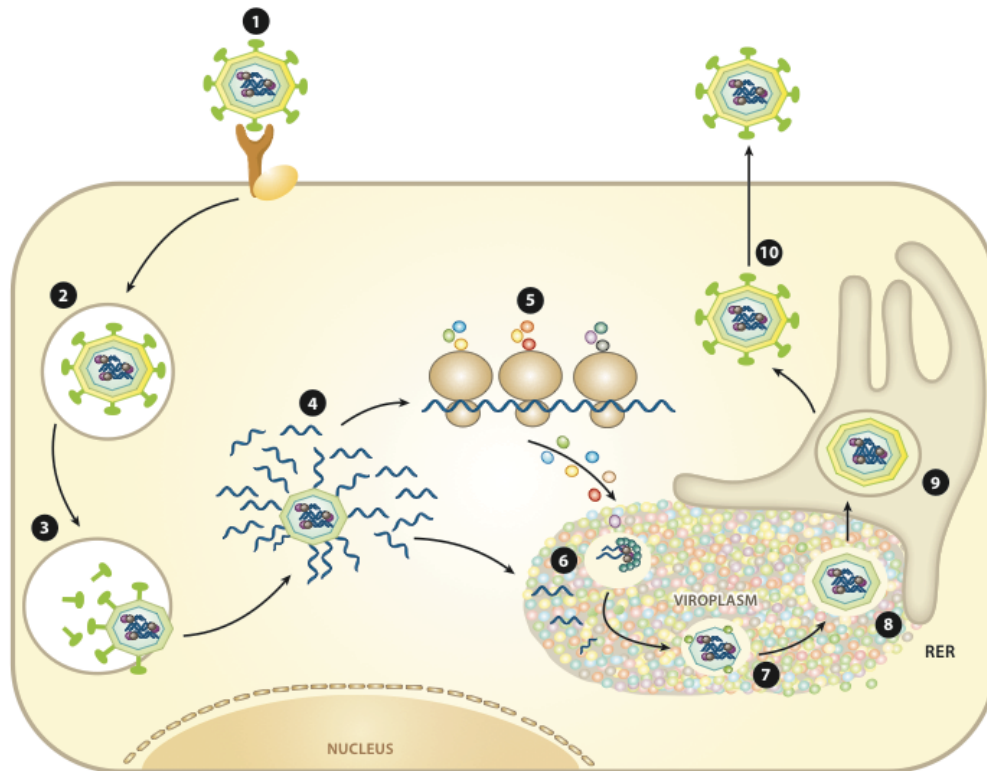


Figura 1.1: Ciclo replicativo de los rotavirus. Tomada de (3).

1.1.5 Eventos iniciales durante la infección

El término entrada, definido como el primer paso del ciclo infeccioso de un virus, describe la manera en la que un virus puede atravesar la membrana celular para llegar hasta el citoplasma. En el caso de los rotavirus, el (o los) mecanismo(s) mediante el cual estos virus entran a su célula hospedera siguen en estudio. Se ha propuesto que durante este proceso, la partícula viral podría sufrir cambios conformacionales; causados en parte por su interacción secuencial con varios de los receptores que han sido descritos para dichos virus. Las proteínas VP4 y VP7 han sido ampliamente estudiadas ya que están involucradas en las interacciones iniciales del virus con su célula huésped. Se han identificado varias moléculas celulares que podrían servir como receptores para los rotavirus. Para el rotavirus de simio de la cepa RRV, el ácido siálico, diversos glicanos, las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_x\beta_2$ y $\alpha_4\beta_1$ y la proteína Hsc70 juegan un papel importante en la unión y entrada a su célula huésped (13, 14).

➤ La proteína VP4

VP4 es una proteína clave en la entrada del virus a su célula huésped. Algunas de las propiedades que se le han identificado a la fecha son: hemaglutinación, unión a la célula huésped, aumento en la infectividad por el tratamiento con tripsina, virulencia y antigenicidad, entre otras (15, 16). Para que el virus sea infeccioso, éste tiene que ser tratado con tripsina, lo cual produce tres cortes muy cercanos en VP4 (aminoácidos 231, 241 y 247), generando así dos productos de proteólisis: 1) la proteína VP8 (231 aminoácidos) localizada en el extremo amino terminal de VP4 y 2) la proteína VP5 (528 aminoácidos) hacia el extremo carboxilo de VP4 (ver Figura 1.2).

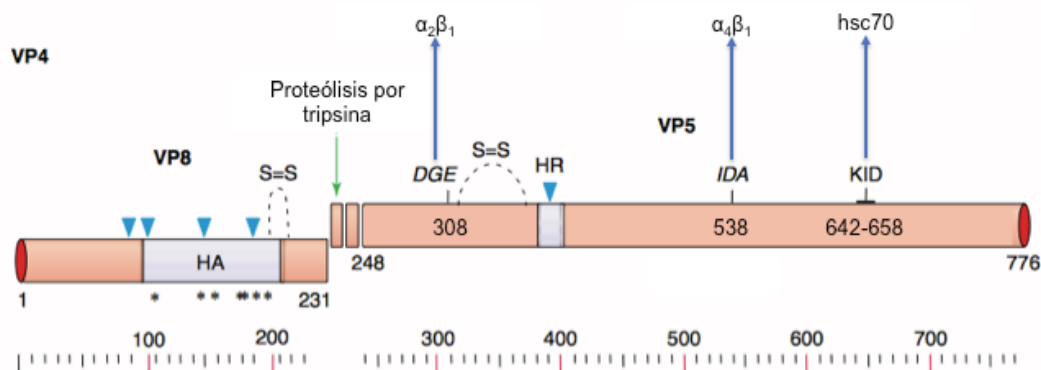


Figura 1.2: Esquema de la proteína VP4. La escala representa a los aminoácidos que conforman a la proteína. HA; dominio de hemaglutinación, los asteriscos en la parte inferior indican los aminoácidos de importancia para la unión de esta proteína con el AS; 101, 144, 155, 187 y 190. Las cabezas de flecha en azul, señalan los aminoácidos a los cuales se unen los anticuerpos neutralizantes empleados en este trabajo. Los puentes disulfuro entre los residuos C203 y C216 así como el formado entre los residuos C318 y C380 son indicados como S=S. HR; región hidrofóbica. Se indican los tripéptidos de interacción con sus respectivos receptores celulares. Modificada de (17).

La proteína VP8 de algunas cepas de rotavirus, contiene un dominio de unión a los ácidos siálicos (AS), comprendido entre los aa 93 y 208 de la proteína, el cual confiere a éstos virus la capacidad de aglutinar eritrocitos. La infectividad de estos virus es abatida por el tratamiento de las células con la enzima neuraminidasa (NA), la cual hidroliza los residuos de AS terminales presentes en las moléculas de la superficie celular. De ahí que las cepas de rotavirus fueran clasificadas inicialmente como NA-resistentes o NA-sensibles. Sin embargo, se ha reportado que rotavirus inicialmente clasificados como NA-resistentes pueden interactuar con AS subterminales, que no son susceptibles a la actividad hidrolítica de la NA pero forman parte de moléculas de la superficie celular, como los gangliósidos. Ejemplos de

estos virus son la cepa bovina UK y la cepa humana Wa. No obstante, los AS terminales o subterminales no son las únicas moléculas que pueden ser reconocidas por la proteína VP8. Recientemente se demostró que cepas de rotavirus NA-resistentes de origen humano son capaces de reconocer y unirse a carbohidratos de los grupos sanguíneos mediante su proteína VP8 (9).

En la proteína VP5 también se han identificado dominios de unión con proteínas presentes en la superficie celular: un dominio que interacciona directamente con la membrana celular y que involucra a los residuos 265-279, así como otro dominio localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la región comprendida entre los aminoácidos 248-474 que está implicado en la permeabilización de las membranas. En VP5 también se encuentran los tripéptidos: a)DGE implicado en el reconocimiento de la integrina $\alpha_2\beta_1$, b)IDA que interacciona con la integrina $\alpha_4\beta_1$. Esta proteína contienen dos regiones implicadas en el reconocimiento e interacción con la proteína constitutiva de estrés calórico Hsc70. Una de estas regiones es el “dominio KID” localizado entre los aminoácidos 642-658 de VP5. La segunda región reportada se encuentra entre los residuos 531-554 (17, 39).

➤ La proteína VP7

VP7 es una glicoproteína de 326 aminoácidos que se ensambla en trímeros para formar una capa uniforme sobre la DLP. Mediante estudios bioquímicos y funcionales se demostró que este ensamblaje es dependiente de calcio (18). También se encontró que el tratamiento de TLPs con agentes quelantes de calcio como el EDTA resulta en la pérdida de la capa externa de su cápside. Lo anterior genera DLPs que por si solas no son capaces de ingresar a la célula y por lo tanto los viriones pierden su capacidad infecciosa.

La proteína VP7 interacciona directamente con moléculas de superficie de la célula hospedera en un paso subsecuente al anclaje inicial del virus mediante VP4. Las proteínas VP7 de diferentes cepas de rotavirus contienen varios motivos de unión a integrinas descritos en la Figura 1.3.

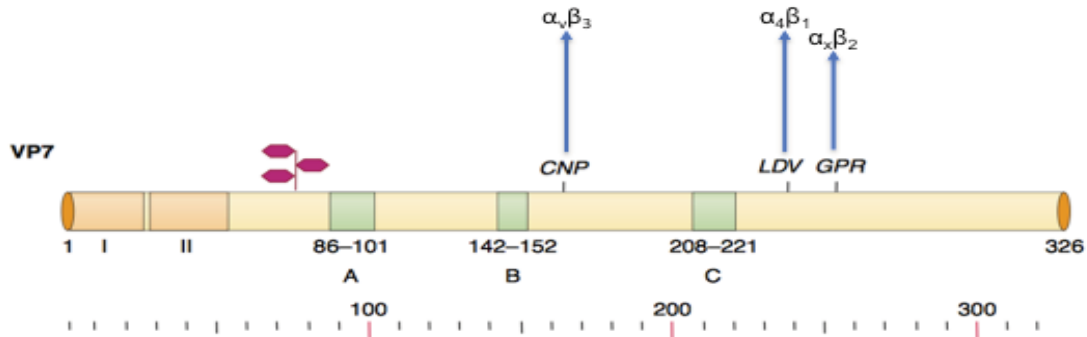


Figura 1.3: Esquema de la proteína VP7. La escala representa a los aminoácidos que conforman a la proteína. El sitio conservado de N-glicosilación se indica con las figuras de hexágonos rosas. A, B y C indican las regiones más antigénicas de VP7. Los triptéptidos de interacción con receptores celulares son indicados y descritos en el texto. Tomada de (17).

➤ Entrada de los rotavirus a la célula

Las primeras etapas de una infección viral consisten en el anclaje de las partículas virales a sus receptores celulares, seguido por la internalización del virus, la replicación del genoma viral y la síntesis de las proteínas que darán origen a la progenie viral.

In vivo, los rotavirus presentan un tropismo celular específico, infectando principalmente a los enterocitos de las puntas de las vellosidades intestinales. Pero también se ha descrito que los rotavirus pueden diseminarse extraintestinalmente, causando viremia. *In vitro*, estos virus se unen a la superficie de casi todas las líneas celulares probadas, pero solo infectan de manera eficiente a algunas líneas celulares derivadas de epitelio renal e intestinal (14, 17, 18). En nuestro laboratorio, se ha propuesto un modelo de las interacciones tempranas del rotavirus de simio RRV en la línea celular MA104. Acorde a este modelo, la interacción de RRV con la célula huésped se da por un proceso de pasos múltiples y secuenciales, dentro de los cuales la interacción inicial se lleva a cabo entre el dominio VP8 de VP4 y un receptor celular que contiene AS. La interacción inicial del virus con el receptor que contiene el AS posiblemente induce un cambio conformacional en la proteína VP4, que permite la interacción subsecuente del motivo DGE (presente en el dominio VP5 de esta proteína) con la integrina $\alpha_2\beta_1$. Posterior a esta segunda interacción, ocurren tres más. Se propone que las primeras interacciones del virus con su célula huésped podrían promover cambios conformacionales en la partícula viral que facilitarían la interacción entre: 1) el dominio CNP de VP7 y la integrina $\alpha_v\beta_3$, 2) el triptéptido GRP de VP7 y la integrina $\alpha_x\beta_2$ y 3) el dominio KID

de VP5 con la proteína hsc70, pese a que se desconoce cuál es el orden en el que se llevan a cabo las mismas. Posterior a las interacciones con sus receptores, los rotavirus se internalizan en la célula, pierden la capa proteica externa de su cápside y posteriormente las DLPs generadas son liberadas al citoplasma, lugar donde el virus continua con el siguiente paso de su replicación (17). Cabe mencionar que este modelo de interacciones tempranas de RRV con la línea celular MA104 no es común para todos los rotavirus, ya que se ha observado que varias cepas de estos virus pueden reconocer otras moléculas de la superficie celular e incluso presentan requerimientos de receptores diferentes a los de RRV. En la Tabla 1.1 se resumen algunos de los requerimientos descritos hasta la fecha para algunas cepas de rotavirus de particular interés para este trabajo (14, 39).

Tabla 1.1: Requerimientos de receptores de diferentes cepas de rotavirus. Adaptada de (39).

Rotavirus	Origen	Moléculas de superficie	Requerimiento o reconocimiento
RRV	Simio	AS-terminales	Si
		Gangliósidos*	Si
		Integrinas	Si
		Hsc70	Si
		PDI	Si
Nar3	Simio	SA-terminales	No
		Gangliósidos	Si
		Integrinas	Si
		Hsc70	Si
		PDI	Interacción no determinada
UK	Bovino	SA-terminales	No
		Gangliósidos	Si
		Integrinas	Si
		Hsc70	Si
		PDI	Interacción no determinada

*Gangliósidos que contienen SA-terminales o subterminales.

Los rotavirus ingresan a la célula a través de un proceso endocítico, el cual puede variar dependiendo del tipo de célula y la cepa del virus. Por ejemplo, en la línea celular MA104, el rotavirus bovino UK entra por endocitosis mediada por clatrina, mientras que el rotavirus RRV lo hace a través de una vía endocítica no del todo caracterizada, independiente de clatrina y caveolina, pero dependiente de la dinamina 2, RhoA, cdc42, actina-4 y colesterol (14).

1.2 Inmunidad innata contra de las infecciones virales

Los mamíferos estamos expuestos continuamente a microorganismo patógenos, pero raramente éstos son capaces de establecer una infección hasta el punto de causar una enfermedad, esto es debido a nuestro sistema inmune innato, que por si mismo podría contender con prácticamente cualquier infección. Generalmente, la respuesta inmune innata contra patógenos es iniciada por el reconocimiento de componentes específicos de los microorganismos como los ácidos nucleicos, a través de receptores de reconocimiento a patrones (PRRs). El reconocimiento de estos componentes por los PRRs resulta en la activación coordinada de factores de transcripción que culmina en la expresión de quimiocinas y citocinas como los interferones (IFN). Los interferones por si mismos podrían ser capaces de contender con casi cualquier infección viral a través de diferentes mecanismos; no obstante, los virus han desarrollado sorprendentes mecanismos para modular la respuesta de IFN y poder completar exitosamente su ciclo infeccioso (19-21).

1.2.1 Respuesta mediada por los Interferones (IFN)

Los interferones (IFN) constituyen una familia evolutivamente conservada de citocinas pleitrópicas con efecto antiviral, inmunomodulador, antiproliferativo y antiinflamatorio. Son glicoproteínas solubles de 5-50 kDa, formadas por 150 aminoácidos en promedio y son producidos por una gran variedad de células. Los IFN están involucrados en enviar señales indispensables en la comunicación inter e intracelular, especialmente entre las células del sistema inmune. En humanos, estas citocinas se agrupan en tres grupos diferentes con base en su secuencia, localización cromosomal y el receptor al que se unen (22-24):

- **Interferones Tipo I (IFN I):** Comprenden a los IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ e IFN ω . Dada su potente e inherente actividad antiviral, se les ha considerado como la primera línea de defensa contra las infecciones virales, son principalmente secretados por las células dendríticas plasmacitoides, macrófagos, linfocitos y fibroblastos.
- **Interferones tipo II (IFN II):** Comprende al IFN γ el cual es producido por los linfocitos T y las células NK activadas por mitógenos. Llevan a cabo funciones inmunomoduladoras.
- **Interferones tipo III (IFN III):** Esta familia, recientemente descrita, comprende a los IFN λ_1 , λ_2 , λ_3 y λ_4 , los primeros tres son conocidos como Interleucina 29 (IL-29), IL-28A e IL-28B respectivamente (25). Se les ha descrito actividad inmunomoduladora, principalmente durante el embarazo (24) y actividad antiviral, similar a la de los interferones tipo I, estos son principalmente secretados por células dendríticas así como células epiteliales de mucosas (21, 22, 26).

Todos los miembros de la familia de los IFN tienen actividad antiviral; sin embargo, sólo los IFN I y III son considerados como la primera línea de defensa contra los virus. Los IFNs tienen como función principal el bloquear la replicación viral y son capaces de controlar la gran mayoría de las infecciones virales en ausencia de la respuesta inmune adaptativa (21-24, 27). Por simplicidad, en el resto del manuscrito se refiere a los IFN tipo I y III de manera genérica como IFN.

En general, cualquier célula nucleada de mamífero es capaz de producir IFN, pero en estado basal no lo producen ni lo secretan, sólo lo hacen en pequeñas cantidades y bajo ciertos estímulos (24). La transcripción de los genes que codifican para IFN ocurre sólo después de la exposición a un inductor apropiado. Esta transcripción es activada por una secuencia altamente orquestada de eventos de señalización que involucra la participación de sensores virales, proteínas adaptadoras, cinasas y factores de transcripción (ver Figura 1.4) (20). Esta cascada de señalización lleva a la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y de los factores de regulación de IFN (IRFs), los cuales al traslocarse al núcleo y unirse a sus secuencias promotoras específicas, inducen la transcripción de los mRNAs de IFN.

Los IFN recién sintetizados son secretados desde la célula infectada y pueden actuar de manera parácrina o autócrina, uniéndose a sus receptores presentes de manera constitutiva en la membrana citoplasmática. Aunque los receptores para IFN I y III son completamente diferentes, ambos inducen una señalización a través de la vía de las JAK/STAT (Janusquinas/transductores de la señal y activadores de la transcripción) que son en general, indistinguibles. El resultado final es la activación transcripcional de más de 300 genes, conocidos en conjunto como genes estimulados por IFN (ISGs), que confieren a la célula infectada o a las células vecinas un estado antiviral, ya que dichos genes codifican para efectores antivirales directos o moléculas que regulan la respuesta de IFN u otros aspectos de la respuesta inmune del huésped, como enzimas, factores de transcripción, glicoproteínas de membrana, citocinas, quimiocinas y un gran número de moléculas aún no caracterizadas ([19](#), [20](#), [28](#)). Aunque la función de la gran mayoría de estos efectores antivirales es desconocida, los mecanismos de acción reportados hasta la fecha están dirigidos a prevenir procesos muy conservados del ciclo infeccioso de los virus, como por ejemplo:

- *Entrada.*
- *Síntesis de ácidos nucleicos;* moduladores de la integridad de los ácidos nucleicos como OAS/RNasa L, ADAR1, familia de las APOBEC.
- *Traducción de proteínas:* PKR, IFITs.
- *Salida:* teterina, BST2.

Los productos de los ISGs son diversos e impiden la replicación viral por distintos mecanismos. Sin embargo, si estos mecanismos no son suficientes para frenar la replicación viral, los ISGs causarán en última instancia, la muerte de la célula infectada ([20](#), [27](#)).

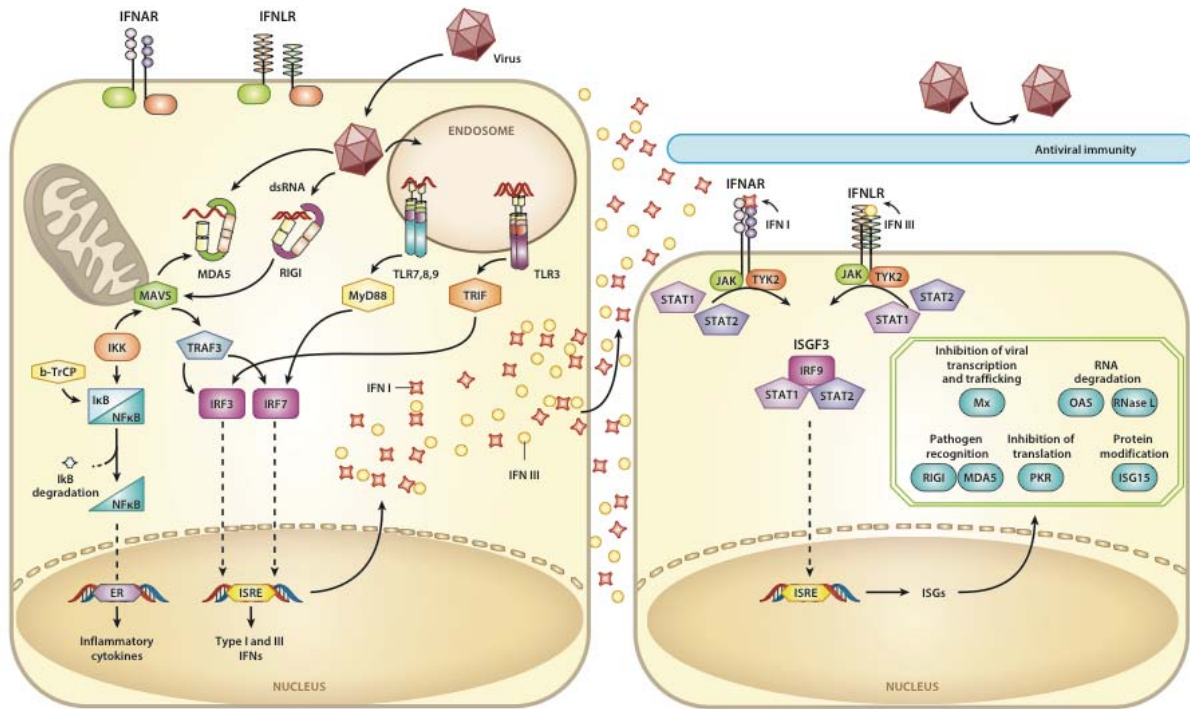


Figura 1.4: Respuesta de IFN. Las infecciones virales activan una gran variedad de respuestas celulares que son iniciadas por el reconocimiento de componentes virales por receptores celulares (PRRs), como los LRLs o TLRs, que están presentes en la célula hospedera. Una vez que dichos receptores son activados, estos median la formación de complejos de señalización que promueven la activación de genes antivirales. Los TLRs emplean en su cascada de señalización a las moléculas MyD88 y TRIF como proteínas adaptadoras, mientras que la MDA5 y RIG I señalizan a través de la proteína mitocondrial MAVS. Ambas cascadas convergen en la activación de ciertos factores de transcripción que incluyen al IRF3, IRF7, NF-κB, los cuales posteriormente son translocados al núcleo, para activar la transcripción de los genes que codifican para IFN. Los IFN recién sintetizados son entonces secretados al medio extracelular, en donde pueden actuar de manera parácrina o autócrina uniéndose a sus receptores presentes en la membrana celular (IFNAR e IFNLR). Esta unión ligando receptor, induce la activación de la vía de las JAK/STAT, en donde una vez que las STAT 1 y STAT 2 son fosforiladas, se asocian con el IRF9 para formar el complejo ISGF3, el cual es translocado al núcleo para inducir la transcripción de más de 300 genes, conocidos en conjunto como genes estimulados por IFN (ISGs), cuyos productos tienen actividad antiviral de manera directa o indirecta. Tomado de (3).

Para generar una infección productiva, los virus deben sobrepasar la actividad antiviral de estos efectores y de los mecanismos de defensa de su huésped y este es el caso de muchas infecciones virales. En la caracterización de cómo ciertos virus superan los mecanismos de defensa de su hospedero, se ha podido elucidar las funciones de un gran número de las proteínas con actividad antiviral conocidas hasta la fecha. También es importante tener presente que los IFN tienen otras actividades, como por ejemplo; promover el crecimiento, diferenciación y función de diferentes células del sistema inmune, además de modificar la

actividad de células inmunes una vez que éstas ya están activadas para potenciar su efecto contra células tumorales o infectadas por virus ([21](#)).

1.2.2 La vía 2´5-Oligoadenilato Sintetasa/Ribonucleasa L (OAS/RNasa L)

La Ribonucleasa Latente (RNasa L) y las 2´5-Oligoadenilato Sintetasas (OAS) son proteínas inducibles por IFN, en conjunto constituyen uno de los mecanismos antivirales más potentes con los que cuenta prácticamente cualquier célula nucleada de mamífero para hacer frente a las infecciones virales. En humanos se han descrito 4 genes que codifican para las OAS: *oas1*, *oas2*, *oas3* y *oasL*, que dan origen al menos a 20 isoformas. Las OAS son parte de la familia de receptores intracelulares (PRRs) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), son proteínas citosólicas que funcionan como sensores del dsRNA; el PAMP por excelencia de las infecciones virales ([29-31](#)).

Durante una infección viral, el dsRNA es reconocido por las OAS, las cuales se encuentran presentes de manera constitutiva en el citoplasma celular, pero en su forma inactiva, que corresponde a su forma monomérica. Al unirse al dsRNA, se induce un cambio conformacional en estas proteínas, permitiéndoles su oligomerización; estos oligómeros constituyen la forma activa de la enzima, que es capaz de convertir el ATP a pirofosfato y a una inusual serie de oligoadenilatos colectivamente llamados 2´5-oligoadenilatos (2´5-A). Estos 2´5-A se unen con alta afinidad a los monómeros de la RNasa L, induciendo un cambio conformacional que permite la dimerización de dicha enzima. El dímero RNasa L tiene actividad de endonucleasa, que corta RNA de cadena sencilla; como el RNA ribosomal (rRNA) y mensajero (mRNA) en secuencias ricas en UU y UA del extremo 3´. La actividad antiviral de la RNasa L es mediada por diferentes mecanismos, resultado del efecto del corte de diferentes sustratos tanto virales como celulares, que a su vez dependen de varios factores como el tipo de virus y la célula huésped. En resumen, la RNasa L puede inhibir la replicación viral por los siguientes mecanismos: i) prevención de la replicación, ii) inhibición de la síntesis de proteínas virales, mediante la degradación de los mensajeros virales, iii) restricción de la replicación viral. Por ejemplo, para virus de DNA, la RNasa L degrada los mensajeros virales, inhibiendo así la síntesis de proteínas virales. No obstante, la RNasa L también puede

degradar componentes celulares, que son esenciales en la replicación viral, como los RNAs ribosomales o algún mensajero cuyo producto es requerido para la replicación del virus. Además, los RNAs pequeños, producto del corte de la RNasa L, son capaces de amplificar la respuesta celular activando otros miembros de los PPRs citosólicos, como RIG-I y MDA-5. En última instancia, la RNasa L activa induce la muerte de la célula infectada por apoptosis y/o autofagia para evitar la replicación viral, por mecanismos aún no del todo caracterizados (29, 30, 32-35) (ver Figura 1.5).

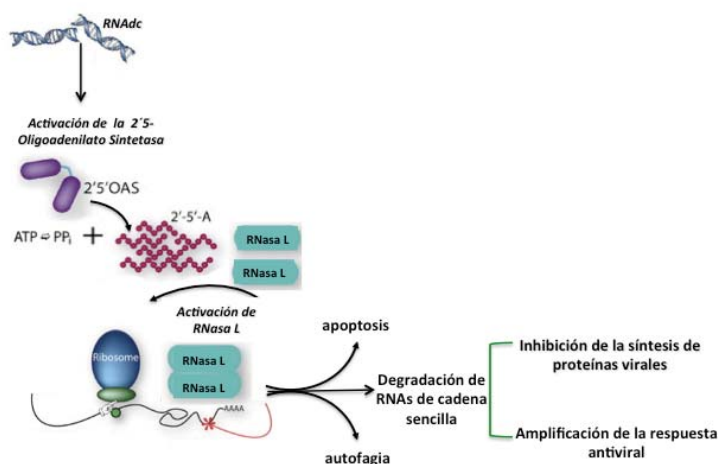


Figura 1.5: Vía 2'-5'-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L activada por el dsRNA. Adaptada de (36).

➤ Regulación de la vía OAS/RNasa L

Los 2'-5'-A comprenden una serie de oligoadenilatos trifosfatados en su extremo 5'. Son adenosinas unidas entre sí por enlaces 2'-5'-fosfodiéster (ver Figura 1.6), resistentes a la acción de las RNasas más conocidas. Dado que la RNasa L se expresa de manera constitutiva, se ha sugerido que la concentración de los 2'-5'-A controla la actividad de la RNasa L, en este control se ha propuesto la participación de al menos dos familias de enzimas: a) 5'-Fosfatasa y b) 2'-Fosfodiesterasas (2-PDEs).

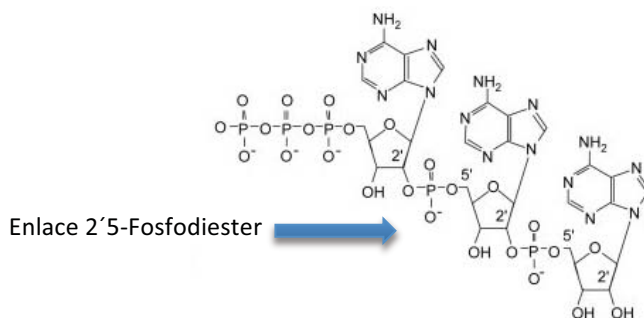


Figura 1.6: Estructura química de los 2'5-oligoadenilatos.

La participación de estas dos familias de enzimas en la regulación del complejo OAS/RNasa L ha sido apenas estudiada. En 2004, Kubota y colaboradores reportaron el posible papel antagónico de las PDEs sobre el complejo OAS/RNasa L, empleando RNAs de interferencia y un fármaco inhibidor de las mismas, encontraron que la replicación del virus vaccinia disminuye drásticamente cuando la concentración de estas proteínas o su actividad están disminuidas. Con respecto a las 5'-fosfatasa, las evidencias sugieren que su efecto es parcial; al remover los grupos fosfatos del extremo 5' de los 2'5-A se compromete drásticamente la actividad de estas moléculas para activar a la RNasa L. No obstante, estos 2'5-A aún son capaces de inducir la dimerización de la RNasa L. En contraste, la capacidad inductora de los 2'5-A es abatida por completo cuando son hidrilizados por las PDEs. El inhibidor endógeno de la RNasa L (RLI) también es un mecanismo de control de la célula para regular la actividad del complejo OAS/RNasa L ([32](#), [37](#), [38](#)).

El grupo de Susan Weeis fue el primero en reportar que la vía OAS/RNasa L puede ser regulada a nivel de los 2'5-A mediado por una proteína viral. Encontraron que la proteína ns2 del coronavirus murino (MHV) tiene actividad de fosfodiesterasa y que esta proteína es capaz de degradar *in vitro* a los 2'5-A, previniendo así la activación de la RNasa L. Estudios en modelos celulares y animales revelaron que la actividad de fosfodiesterasa de la ns2 es esencial para la replicación del virus en macrófagos y para inducir hepatitis ([38-40](#)).

La ns2 y el extremo C-terminal de la VP3 de los rotavirus tienen un dominio de PDE a nivel de secuencia. Dichas proteínas comparten un 18% de identidad. Se ha demostrado su capacidad de hidrolizar a los 2'5-A, previniendo la activación de la RNasa L, favoreciendo así el crecimiento y la patogénesis viral ([40](#)). También estas proteínas son funcionalmente

intercambiables. Bajo el contexto de la infección con MHV, se ha reportado que las quimeras del MHV que expresan una forma inactiva de ns2 y la VP3-CTD, recuperan la habilidad de replicarse de manera eficiente en macrófagos o en el hígado de ratones infectados, mientras que en las quimeras que expresan una forma de VP3-mutación que tiene mutado un aminoácido esencial para su actividad como fosfodiesterasa, la replicación de este virus quimérico es deficiente ([38](#), [40](#)).

II. ANTECEDENTES

2.1 Los rotavirus modulan la respuesta mediada por los interferones tipo I

En la infección por rotavirus, la actividad de IFN I ha sido ampliamente estudiada y debatida en los últimos años. Hasta el momento, es claro que la infección con RVs induce la producción de IFN en humanos y otros mamíferos, sin embargo su relevancia en el control de la infección y la enfermedad no es del todo comprendida. Diversos reportes han demostrado que el control de la replicación por IFN de algunos RVs está restringida a células permisivas y en ciertos modelos animales como el de ratones lactantes, terneros recién nacidos y lechones (41). A nivel de la enfermedad, el pretratamiento con IFN I es capaz de reducir la gravedad de los episodios diarreicos en terneros, mientras que en ratones, el resultado es controversial, abarca desde un efecto protector, irrelevante hasta perjudicial (4). También, se ha descrito que dicha respuesta es dependiente de la cepa viral así como de la célula hospedera. Por ejemplo, la replicación de la cepa bovina UK en fibroblastos murinos está restringida por la respuesta de IFN, mientras que la cepa de simio RRV es insensible a tal respuesta (3, 42). El papel de IFN III en la infección con RVs comienza a caracterizarse. Estas moléculas son particularmente interesantes en la infección con estos virus, desde que su relevancia como parte de los mecanismos de defensa de las superficies epiteliales en la infección con otros patógenos comenzó a describirse (25), lo cual hace sentido con la distribución tejido específica del receptor de IFN III; presente casi exclusivamente en las células epiteliales de los intestinos, pulmones y piel. Aunque las poblaciones celulares involucradas en la producción de IFN III son poco conocidas y que las evidencias sugieren que éstas se sobrelapan con las poblaciones de células productoras de IFN I, es importante destacar que *in vivo* la respuesta de IFN I y III no es completamente redundante, ya que cada uno de estos tipos de IFN tiene una particular contribución antiviral que depende del tipo de virus y de la célula hospedera (25, 43, 44).

Reportes recientes sugieren que la actividad antiviral de IFN III es de mayor relevancia que la de IFN I en el control de la infección por RVs. En ratones carentes del receptor para IFN III, se encontró que estos virus se replican a niveles más altos, en comparación con ratones

silvestres. Adicionalmente, el pretratamiento con IFN III resultó en la reducción de la replicación viral en ratones (45). Como se mencionó en la introducción, los IFN son capaces de ejercer su actividad antiviral mediante diversos mecanismos, sin embargo la identidad de las moléculas antivirales relevantes en este control es poco conocida. Al igual que muchos otros virus, los rotavirus codifican para proteínas que les permiten contender con la respuesta celular antiviral; hasta el momento se conocen algunas estrategias por las cuales los rotavirus antagonizan dicha respuesta, en las cuales están implicadas al menos las siguientes proteínas virales (3, 41, 46):

NSP1: Es la proteína viral antagonista al sistema de IFN mejor caracterizada. Es una proteína de aproximadamente 57 kDa, que entre las diferentes cepas de rotavirus es la proteína más variable. La NSP1 tiene en su extremo amino terminal el dominio conservado RING y en su extremo C-terminal, un dominio variable que le permite interactuar con diferentes proteínas celulares para mediar su degradación (47-49). La primera evidencia que sugirió el importante papel de la NSP1 en el control de la respuesta antiviral se obtuvo a partir de ensayos de dos híbridos, en los que se observó la interacción directa de la NSP1 con la proteína celular IRF3 (4). Posteriormente, se demostró que la NSP1 también puede mediar la degradación de otros factores de regulación de los IFNs, como IRF3, IRF7, IRF5 e IRF9 (46). La proteína NSP1 interfiere con la respuesta antiviral de distintas maneras e involucra, además de su interacción con los IRFs, otras proteínas celulares que son importantes en la respuesta antiviral. Para cepas de rotavirus que infectan humanos, se ha descrito que el control de IFN mediado por NSP1 involucra la degradación de la proteína β -TrCP, una E3 ligasa esencial en la activación de NF- κ B (48, 50). Otras cepas de rotavirus median la degradación de los receptores para INF I (IFNAR) (51), IRAK1 (52), TRAF 2 (proteína involucrada en la señalización de diversos receptores celulares y activación de la NF- κ B) (53), RIG-I (54) y MAVS (55). También se ha reportado que la NSP1 de ciertos rotavirus puede inducir la degradación de p53 (56), que es considerado como un factor de regulación maestro que promueve la apoptosis en células estresadas. Algunas cepas de RVs son capaces de inhibir la translocación de las STATs al núcleo, aunque la participación de NSP1 en este proceso es controversial (57).

El importante papel de NSP1 para prevenir la respuesta antiviral es evidente, su capacidad de interactuar con diversas proteínas celulares a través de su extremo carboxilo terminal es clave para dicha función. Pese a que los mecanismos moleculares involucrados en la degradación de sus blancos aún no son elucidados por completo, es claro que están en función de la cepa viral y de la célula hospedera y en general, esta degradación es mediada por el proteosoma (3).

NSP3: Los rotavirus controlan la respuesta celular antiviral de manera muy específica mediante las proteínas NSP1 y VP3 (ver mas adelante); cuentan además con la proteína NSP3, que durante la infección inhibe la traducción de los mensajeros celulares. Si bien esta inhibición es general, los mensajeros de las proteínas celulares de respuesta a las infecciones virales también son afectados. Los mecanismos involucrados en este fenómeno son diversos, la proteína NSP3 se une al complejo de inicio de la traducción eIF4F y previene la unión de los mRNAs celulares unidos a la poli-A-polimerasa (PABP), además se ha encontrado que la PABP y los mRNAs celulares se acumulan en el núcleo durante la infección, previniendo su traducción. Por otra parte, también se ha descrito que durante la infección el factor de inicio de la traducción eIF2-alfa (eIF2- α) se encuentra fosforilado, lo que causa una severa inhibición de la síntesis de proteínas celulares (3, 58-61).

VP3: La proteína VP3 es una proteína multifuncional de unión al RNA de cadena sencilla. Tiene actividad de guanilil-metil-transferasa, responsable de la adición del Cap en los extremos 5' de los transcritos virales y de su 2'-O-metilación. Recientemente, su actividad como 2'5-fosfodiesterasa (PDE) fue demostrada *in vitro*. En la Figura 2.0 se representa la organización de la VP3 de diferentes cepas de rotavirus, obtenida mediante enfoques bioinformáticos (47, 62).



Figura 2.0: Esquema de organización de los dominios de la proteína VP3 para diferentes cepas de rotavirus. La escala representa a los aminoácidos que conforman a la proteína. Cada uno de los dominios funcionales de la VP3 está representado con diferentes colores: gris, función desconocida; verde, N7-MTasa; púrpura, 2'-O-MTasa; azul, GTasa/RTPasa; azul celeste, PDE. La intensidad de los colores está acorde a la certidumbre en la identidad del dominio. Tomada de (62).

La participación de VP3 en el control de la respuesta inmune ha sido evidente desde que los estudios con virus rearreglantes mostraron que el gen que codifica para la VP3 co-segregaba con la virulencia de ciertas cepas de rotavirus (63). Mediante enfoques bioquímicos, la actividad de VP3 como *guanilil-metiltransferasa* fue demostrada (64). Se ha propuesto que la VP3 de los rotavirus modula la respuesta inmune innata al adicionar el Cap en el extremo 5' de los transcritos virales, previniendo así la activación de sensores celulares como RIG-I, MDA-5, o bien proteínas como las IFIT1, las cuales al reconocer RNAs mensajeros que carecen de la 2'-O metilación, inhiben su traducción (47). Recientemente, se describió la actividad de VP3 como PDE, que también está involucrada en el control de la respuesta inmune. Esta actividad de VP3 como PDE será descrita mas adelante.

La secuencia del extremo C-terminal de la proteína VP3 de los rotavirus del grupo A se puede agrupar en la familia de las 2H fosfodiesterasas, ya que contiene el sitio catalítico característico de los miembros de esta familia, que consiste en el motivo repetido "His-X-Ser/Thr" (47), cuya posición en esta proteína se muestra en la Figura 2.1. Pese a que la actividad como PDE de VP3 y de otras proteínas virales, fue predicha *in silico* desde hace más de 10 años (65), su caracterización funcional es reciente. Ahora se cuenta con la estructura cristalográfica del extremo C-terminal de VP3 unida a los 2'5-A, lo que ha permitido conocer a mayor detalle la actividad de VP3 como PDE.

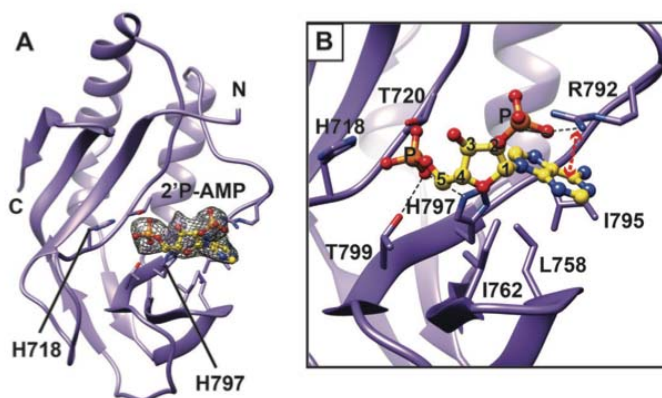


Figura 2.1: Interacciones moleculares entre el DTC de la VP3 de los RVA con los 2'5-A. Estructura cristalográfica del complejo cristalizado 2'5-A/DTC VP3 de los RVA, las posiciones de las histidinas del sitio catalítico son señaladas (A). En (B) se muestra a mayor detalle las interacciones de la VP3 con los 2'5-A. Tomada de (62).

2.2 Los virus modulan la vía antiviral OAS/RNasa L

El complejo antiviral OAS/RNasa L tiene actividad frente a varios tipos de virus. Su efectividad ha sido probada tanto *in vitro* como *in vivo* durante infecciones por numerosos virus de RNA y DNA, como el virus del Nilo Occidental, herpes simplex, HIV, flavivirus, virus de la hepatitis murina, etc. La relevancia de este complejo antiviral para limitar las infecciones, se ve reflejada en los diferentes mecanismos que los virus han desarrollado para contender con sus efectos deletéreos. La Tabla 2.0 muestra algunos ejemplos del como los virus modulan la vía OAS/RNasa L.

Tabla 2.0: Mecanismos involucrados en la inhibición de la vía OAS/RNasa L en infecciones virales. Adaptada de (30, 32, 36, 39, 66).

VIRUS	NIVEL DE ACCIÓN	MECANISMO
Herpes simplex tipo 1 y 2	Síntesis de análogos de los 2'5-oligoadenilatos	Se sintetizan análogos de los 2'5-oligoadenilatos, que se unen a los monómeros de la RNasa L inhibiendo así la dimerización de dicha enzima.
Virus de simio 40 (SV40)		
Hepatitis C (VHC)	Selección de variantes	Los mRNA del VHC-1 expuestos al IFN acumulan mutaciones silenciosas que disminuyen los sitios de corte de la RNasa L.
Vaccinia	Inhibición de la activación de las OAS	Las proteínas virales E3L (vaccinia) y NS1A (influenza) se unen al dsRNA, impidiendo la activación de las OAS.
Influenza A		

Virus de la inmunodeficiencia humana. (HIV)	Aumento del inhibidor endógeno de la RNasa L (IRL)	El HIV aumenta la expresión del Inhibidor endógeno de la RNasa L (IRL). Cuando el IRL se une a la RNasa L en su forma monomérica impide que los oligoadenilatos activen a la RNasa L.
Virus de la hepatitis murina	Degradación de los 2'5-oligoadenilatos	La proteína ns2 tiene actividad de 2-fosfodiesterasa. Degrada a los 2'5-A, previniendo la activación de la RNasa L.

La relevancia de la vía OAS/RNasa L en el contexto de la infección por RVs es desconocida. El interés en su caracterización reside en su potencial antiviral observado en muchas otras infecciones virales. Además, se contaba con la evidencia de que el activador de este complejo se encontraba presente en el citoplasma de las células infectadas por RVs, ya que estudios previos de nuestro grupo de trabajo revelaron la presencia de dsRNA en el citoplasma de células infectadas con rotavirus mediante ensayos de inmunofluorescencia (IF), utilizando un anticuerpo monoclonal anti-dsRNA (67). Se había reportado que, durante la infección con RVs, proteínas celulares de unión al dsRNA, como la PKR (68), la MDA-5 y la RIG-I (69), se encontraban activas. En conjunto, estos datos sugerían que la propuesta de que durante la infección por RVs, el dsRNA se encuentra confinado dentro de estructuras virales que impiden que la respuesta mediada por los IFNs se active en las células infectadas, podría no ser del todo cierta. Durante mi trabajo de maestría, caracterizamos que tan general es la presencia del dsRNA en el citoplasma de células infectadas con diferentes cepas de RVs. Encontramos que la exposición del dsRNA al citoplasma es una característica general entre las distintas cepas estudiadas; RRV, UK y YM, que la presencia de éste se observa desde las 3 horas post infección (hpi), teniendo una colocalización no exclusiva con los viroplasmos, sobre todo en tiempos tardíos de la infección. En nuestro grupo de trabajo, también se encontró que durante la infección con RRV, la proteína cinasa dependiente de dsRNA (PKR) fosforila al factor eIF2- α , no obstante la replicación de los RV no se ve afectada por esta restricción celular (68). Proponemos que el dsRNA que se encuentra en el citoplasma de las células infectadas con RVs es el responsable de activar a la PKR, así como otros mecanismos de la respuesta antiviral de la célula que se activan en respuesta a este inductor, como por ejemplo la vía antiviral OAS/RNasa L. Mi trabajo de maestría se centró en la estandarización

de metodologías que nos permitieran estudiar al complejo OAS/RNasa L. Para tal propósito incluimos un método que nos permitiera medir de manera indirecta la activación de dicho complejo, evaluando la integridad de los RNAs ribosomales (rRNAs) mediante electroforesis capilar, empleando el Bioanalizador Agilent 2100. Así mismo, estandarizamos las condiciones experimentales para el uso de los 2'5-A y el dsRNA como activadores del complejo antiviral en nuestro sistema. Encontramos que en células transfectadas con dsRNA, los rRNAs 18S y 28S, que corresponden a las subunidades pequeña y grande del ribosoma, son degradados, lo que evidencia la activación del complejo OAS/RNasa L y que este complejo es funcional en nuestro modelo celular; las células MA104 ([70-72](#)).

III. HIPÓTESIS

Los rotavirus modulan la vía 2´5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L.

IV. OBJETIVOS

General:

Determinar si la vía 2'5-OAS/RNasa L se activa durante la infección por rotavirus. De ser así, caracterizar el o los mecanismos mediante el cual los rotavirus contienden con los efectos antivirales de dicha vía.

Particulares:

- Evaluar la relevancia de la vía 2'5-OAS/RNasa L en el contexto de la infección por los rotavirus de las cepas RRV y UK.
- Determinar si la vía 2'5-OAS/RNasa L se activa durante la infección por rotavirus.
- Determinar si los rotavirus modulan la activación de las proteínas antivirales 2'5-oligoadenilato sintetasas o de la RNasa L. De ser así, estudiar la participación de cada una de las proteínas virales en la modulación de dicha vía y caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en dicho control.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Líneas celulares y cepas virales. Se empleó la línea celular MA104 clona 1 derivada de células embrionarias de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Para su mantenimiento, la línea celular fue cultivada en medio Advanced Dulbecco Modified Eagle de alta glucosa reducido en suero (DMEM-RS) (Thermo Scientific Hyclone, South Logan, Utah) suplementado con 4% v/v de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Biowest, México). Los cultivos celulares fueron incubados en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Después de formar una monocapa a confluencia, las células se trataron con EDTA [0.02% m/v], tripsina [0.01% m/v] y agitación mecánica para favorecer su desprendimiento. De la suspensión celular obtenida se procedió a cultivar las células en diferentes formatos, según los requerimientos de los ensayos.

Las cepas de rotavirus empleadas fueron: a) cepa de simio RRV; donada por H.B. Greenberg (Stanford University, Stanford CA), b) cepa bovina UK y c) los rotavirus rearreglantes UKxRRV fueron proporcionados por Y. Hoshino del National Institutes of Health (NIAID-NIH, Bethesda, MD) (73), d) la cepa porcina YM; aislada en nuestro laboratorio, e) el rotavirus variante de RRV, Nar3 y su revertante la clona 14 (rNar3-14) fueron generados en nuestro laboratorio (15, 74). Todas las cepas de rotavirus fueron propagadas en células MA104 usando MEM (Minimum Essential Medium) suplementado con 2 µg/mL, de glutamina tal como se describió previamente (75). Los lisados virales para todas las cepas fueron activados durante 30 minutos a 37°C con tripsina a una concentración de 10 µg/mL, a excepción de la cepa UK, que fue activada con una concentración de 1 µg/mL. Los lisados fueron titulados como se describe en la sección de titulación de virus.

5.2 Anticuerpos y reactivos. La Tabla 5.0 resume las características de los anticuerpos primarios empleados en este trabajo.

Tabla 5.0: Características de los anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpo	Antígeno	Características	Fabricante: No cat.
α-RNasa L	RNasa L recombinante	Clona 2E9. IgG de ratón.	Abcam: ab13825
	RNasa L recombinante	Clona 2E9. IgG de ratón. Cadena kappa -1.	Invitrogen: 379900
α-ABCE1	Péptido sintético acoplado a KLH; comprende los residuo 550-hasta el extremo C-terminal de la proteína ABCE1 humana.	Policlonal producido en conejo	Abcam: ab32270
α-OAS1	Péptido sintético que corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos 288-337 de la proteína humana OAS1.	Policlonal producido en conejo.	Abcam: ab99024
α-OAS3	Fragmento recombinante de la proteína humana OAS3 que comprende la región entre los aminoácidos 87-393.	Policlonal producido en conejo.	Abcam: ab154270
α-TLPs	Proteínas virales estructurales de diferentes cepas de rotavirus.	Policlonal producido en conejo.	Preparado en el laboratorio Arias/López
α-NSP5	Proteína NSP5 recombinante de la cepa RRV.	Policlonal producido en conejo.	Preparado en el laboratorio Arias/López.
α-VP1	Proteína VP1 recombinante de la cepa RRV.	Policlonal producido en conejo.	Preparado en el laboratorio Arias/López
α-VP3	Péptido sintético acoplado a KLH; comprende los residuo CLRKIKGDTVFDMSSE de VP3 de la cepa RRV.	Policlonal producido en conejo.	GenScript
α-vimentina	Vimentina humana recombinante	Policlonal producido en conejo	Preparado en el laboratorio Arias/López
J2 (α-dsRNA)	Mezcla da varios RNAs de doble cadena.	Anticuerpo monoclonal hecho en ratón. IgG2a cadena kappa	Scicons:10010200

5.3 Titulación del virus. Monocapas de células confluentes cultivadas en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con MEM y posteriormente inoculadas con diluciones seriadas de los diferentes lisados virales. Transcurrida la hora de adsorción, el inóculo se retiró, las células se lavaron dos veces con MEM y se incubaron durante 14-16 h. A continuación las células se fijaron y permeabilizaron con acetona al 80% en PBS durante 20 minutos a TA. Posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS y procesadas por inmunoperoxidasa para la detección de unidades formadoras de focos infecciosos (UFFs). La inmunoperoxidasa consistió en incubar las células con el anticuerpo α -TLPs a una concentración 1:2000, diluido en PBS durante 1h a 37°C. Después de este lapso, las células fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas con la proteína A acoplada a peroxidasa (*GE Healthcare, Little Chalfont, UK*), diluida 1:3000 en PBS, durante 1h a 37°C. En seguida, las células fueron lavadas dos veces con PBS y como sistema revelador se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno y 3-amino-9-etil carbazol en amortiguador de citratos. El tiempo de revelado fue entre 3 a 5 minutos o hasta observar la presencia de color. Finalmente la reacción fue detenida lavando varias veces con agua. Las unidades formadoras de focos fueron cuantificadas en un microscopio invertido (*Nikon Diaphot 300, Japón*) provisto de una cámara a color (*Q Imaging, Canada*) empleando el software Image-Pro 6.3.

5.4 Ensayos de infectividad. Monocapas de células confluentes cultivadas en placas de 48 o 96 pozos fueron lavadas dos veces con MEM e inoculadas con los lisados virales activados a una MOI de 0.02 durante 1h a 37°C. Finalizado el tiempo de adsorción, el inóculo se retiró, las células se lavaron dos veces con MEM y se incubaron durante 14-16h a 37°C. Al término de la infección, las células fueron fijadas y procesadas por inmunoperoxidasa, como se describe en la sección 5.3.

5.5 Determinación del rendimiento viral. Para determinar el rendimiento de virus infeccioso producido bajo las diferentes condiciones en estudio, las monocapas de células infectadas que recibieron el tratamiento indicado fueron lisadas por tres ciclos de congelamiento-

descongelamiento. Los lisados virales fueron activados y titulados como se describe en las secciones 5.1 y 5.3.

5.6 Inactivación de partículas virales. La inactivación de las partículas virales se realizó de acuerdo a lo descrito por Groene (76). Brevemente, la inactivación consistió en tratar el lisado viral con 10 µg/mL de tripsina durante 30 minutos a 37°C y posteriormente con 40 µg/mL de psoralen (*Sigma-Aldrich*) durante 20 min a 4°C, en agitación constante y protegido de la luz. Posteriormente el lisado viral fue irradiado durante 2 h con luz UV de longitud de onda larga. La distancia entre la fuente de luz UV y el lisado viral no fue mayor a 5 cm. Durante el tiempo de irradiación los lisados se mantuvieron en hielo y en agitación constante.

5.7 Purificación de partículas virales y RNA de doble cadena (dsRNA). Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en frascos fueron infectadas con rotavirus de las cepas UK y RRV a una MOI de 3 y cosechadas a las 12 hpi. Los lisados virales fueron sometidos a tres ciclos de congelación-descongelación y posteriormente sonicados. Se procedió a activar a las partículas virales con tripsina durante 30 minutos a 37°C a una concentración de 10 µg/mL para la cepa RRV y a una concentración de 1 µg /mL para la cepa UK. Terminado el tiempo de incubación, los lisados fueron tratados con el inhibidor de tripsina, el cual se empleó a la misma concentración que la tripsina. Enseguida las partículas virales se concentraron por ultracentrifugación durante 1 h a 40,000 rpm a 4°C en un rotor 45Ti (*Beckman, Fullerton, CA*). Los botones celulares obtenidos fueron resuspendidos en el mínimo volumen del amortiguador TNC (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂).

Posteriormente se realizaron al menos dos extracciones con triclorofluorometano (Freón II), recolectando la fase acuosa, a partir de la cual se obtuvo el RNA genómico o las partículas virales.

Para extraer el dsRNA, la fase acuosa fue recolectada y centrifugada sobre un colchón de sacarosa al 45% durante 1.5 h a 40,000 rpm a 4°C en un rotor SW50.1 (*Beckman, Fullerton,*

CA). Los botones celulares que contenían a las partículas virales semipurificadas se sometieron a extracciones con fenol/cloroformo para obtener el RNA viral.

Para la obtención de DLPs, SIPs y TLPs, a las fases acuosas obtenidas de la extracción con freón se les adicionó CsCl para obtener una densidad de 1.36 g/cm³. Esta mezcla fue centrifugada durante 18 h a 35,000 rpm en un rotor SW 50.1 a 4°C. Las bandas opalescentes, correspondientes a las TLPs, SIPs y DLPs, fueron recolectadas por punción con ayuda de una jeringa de 1 mL y almacenadas a 4°C hasta su empleo. Para asegurar la completa eliminación de la capa externa, las fracciones correspondientes a las DLPs fueron sometidas a una segunda centrifugación isopícnica, empleando el amortiguador TNE (10 mM Tris pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM EGTA pH 8.0).

Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, el CsCl fue removido de los diferentes tipos de partículas virales. Para esto, volúmenes de 17 µL de cada banda correspondientes a TLPs, DLPs y SIPs se desalaron con la resina sephadex G-25 coarse estéril lavada con TNC y empacada en puntas de micropipeta de 200 µL, con el propósito de obtener soluciones de partículas virales libres de CsCl a las cuales se les analizó su perfil proteico. Para tal propósito, 350 ng de proteína total de cada una de las bandas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Terminada la electroforesis los geles se fijaron una hora en una solución metanol/ ácido acético / formaldehído y se tiñeron con plata.

5.8 Lipofección de siRNAs, poly (I:C), dsRNA y 2'5-A. La transfección y cotransfección de siRNAs en células MA104 fue realizada en placas de 48 pozos, mediante el método de transfección reversa descrito previamente ([13](#)). Las secuencias y la concentración de los siRNAs empleados se describen en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Características de los siRNAs. Todos los siRNAs fueron obtenidos de Dharmacon Research (Lafayette, CO).

Producto del gen	Secuencia del siRNA	Concentración empleada [µM]
VP1	ACC AGU GAA UGU CGA UAA AGG	2.5
VP2	CUA GGC AAC UAC CAG UAU AGU	1

VP3	GAA GGU AUG UUG UGU UAA AGA	2.5
VP4	UCU AGG UCC UUU UGC UCA AUU	0.5
VP6	TGG AAC GAU AAU AGC CAG AAA	1
VP7	AAG UCG CUA CAG CUG AAA AAC	1
NSP1	AAU UGG AGC AAA UUC AGU AUG	1
NSP2	GCG UUG AAU UCA AUU AAA GUU	1
NSP3	AAU UGG AUG ACU GAC UCU CGA	1
NSP4	AAG GCC UCG GUU CCA ACC AUG	1
NSP5	AAU CAU CUU CAA CGA CGU CAA	2.5
RNasa L	SMARTpool: ON-TARGETplus RNASEL siRNA	1
OAS1	SMARTpool: ON-TARGETplus OAS1 siRNA	1
OAS3	SMARTpool: ON-TARGETplus OAS3 siRNA	1
Irre	siGENOME Non-Targeting siRNA #3	Misma concentración que el siRNA de prueba

Las células con la mezcla transfectante se incubaron 72h y posteriormente recibieron el tratamiento correspondiente. Para la lipofección del dsRNA y los 2´5-oligoadenilatos (2´5-A); que fueron donados por el Dr. R. H. Silverman (*Cleveland Clinic Foundation*), las células crecidas a confluencia en placas de 48 pozos fueron incubadas con 100 µL de una mezcla del dsRNA viral purificado a una concentración de 10 µg/mL, poly (I:C) a una concentración de 5 µg/mL obtenido de Sigma, Aldrich Co, St Lois MO, o los 2´5-A a una concentración de 2.5 µM. Para todos se empleó como agente transfectante la Lipofectamina 2000 a una concentración de 26.66 µL/mL (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Las células junto con la mezcla transfectante fueron incubadas a 37°C durante una hora, posteriormente, esta mezcla fue reemplazada por MEM y las células fueron incubadas por diferentes tiempos, según los requerimientos del ensayo.

Las DLPs y SIPs fueron transfectadas de manera similar a lo descrito para el dsRNA y el Poly (I:C), empleando como agente transfectante Lipofectamina (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Las DLPs fueron empleadas a una concentración de 10 µg/mL, mientras que las Spikeless fueron usadas a una concentración de 15 µg/mL.

5.9. Marca Metabólica. Para analizar la síntesis de proteínas, monocapas de células crecidas en placas de 48 pozos, tratadas bajo diferentes condiciones, se les cambió el medio 30 min antes del tiempo de cosecha por medio sin metionina, suplementado con 25 $\mu\text{Ci/mL}$ de Easy Tag Express (^{35}S) (*Perkin Elmer, Boston, USA*). Finalizado el tiempo de incubación, las células se lisaron con el buffer de Laemmli (como se indica en la sección de Western blot). Posteriormente, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía en Storage phospho-autoradiography empleando el Typhoon Trio de Amersham Biosciences o empleando la película hipersensible Kodak® X-Omat.

5.10 Ensayos de inmunofluorescencia. Células cultivadas sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro con una confluencia cercana al 90%, fueron lavadas con MEM sin suero para recibir el tratamiento correspondiente. Finalizado dicho tratamiento, las células se fijaron con 200 μL de paraformaldehído disuelto en PBS a una concentración del 2% (m/v) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas 4 veces con la solución de lavado (50 mM NH_4Cl en PBS). Las células se permeabilizaron con 200 μL de la solución de permeabilización (0.5% Tritón Tx-100, 1% BSA, 50 mM NH_4Cl en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con la solución de lavado y se procedió al bloqueo de las muestras con 200 μL de la solución de bloqueo (1% BSA, 50 mM NH_4Cl en PBS) durante 12 h a 4°C, o bien 1 h a TA. Posteriormente, las muestras se lavaron e incubaron a TA durante 1 h con 50 μL de la mezcla de los anticuerpos primarios, empleados a las siguientes concentraciones: a) el anticuerpo J2, 1:3000, b) α -RNasa L, 1:2000, c) α -OAS1, 1:1000 y c) α -NSP5, 1:500, todos diluidos en la solución de bloqueo. Después de este lapso de tiempo, las células se lavaron tres veces con solución de lavado y se incubaron con un coctel de anticuerpos: anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488, anticuerpo anti-Ig de conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 568 (ambos obtenidos de *Molecular Probes California, CA, USA*) y para teñir núcleos se usó el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), todos los anticuerpos se emplearon a una concentración 1:1000 y el DAPI a 300 nm, diluidos en la solución de bloqueo e incubados 1 h en cámara húmeda a TA, protegidos de la luz. Terminado el periodo

de incubación, las muestras fueron lavadas como se describió anteriormente y finalmente los cubreobjetos se montaron con Fluokept (*Argene, Verniolle, French*) sobre portaobjetos pulidos (*Lauka, México*) para ser observadas en el microscopio de epifluorescencia (*Zeiss Axioskop 2 Mot Plus*) acoplado a una cámara digital (*Photometrics Coolsnap HQ*). Las imágenes fueron capturadas digitalmente y editadas en Image J 1.440.

5.11 Detección de proteínas celulares y virales por Western Blot. Para lisar a las células, se trataron con el buffer de Laemmli (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol) y posteriormente fueron hervidas durante 10 min. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y transferidas a una membrana Inmobilon NC (Millipore) durante 1 h a 120 mA, en buffer CAPS (10 mM, pH 11) adicionado con 10% de metanol. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con la solución de bloqueo (5% leche descremada, 0.1% Tween 20 en PBS) durante toda la noche a 4°C, o durante una hora a TA con agitación constante. Finalizado el tiempo de bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente, empleado a las siguientes concentraciones: a) α -RNasa L, 1:2000, b) α -OAS1, 1:2500, c) α -OAS3, 1:1000, d) α -VP1, 1:3000, e) α -NSP5, 1:2500, f) α -vimentina, 1:5000, g) α -TLPs, 1:3000. Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos en la solución de bloqueo e incubados toda la noche a 4°C, o una hora a 37°C. Terminado el periodo de incubación, las membranas se lavaron tres veces; cada lavado de 10 minutos con la solución de lavados (PBS/Tween-20 0.1%) y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo) o proteína A conjugados con peroxidasa, usados a una concentración 1:3000, diluidos en solución de bloqueo suplementada con 5% de leche. Al finalizar la incubación, se hicieron 3 lavados, como se describió previamente. Finalmente las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Lightning®-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor, empleando la película hipersensible Kodak® X-Omat.

5.12 Detección del Cap por Dot Blot. El RNA total extraído de partículas virales o de células, fue desnaturalizado durante 5 minutos a 72°C y enseguida colocado en hielo. Se empleó el aparato Bio-Dot el cual se montó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Bio-Rad, USA) con membrana de nitrocelulosa (*Millipore, Bedford, Mass*). Las muestras de RNA viral y celular fueron colocadas en la membrana en las cantidades indicadas. Una vez secas las muestras, el RNA se fijó a la membrana con luz UV (*Stratalinker Stratagene*), bajo condiciones preestablecidas del equipo y posteriormente procesadas para ensayos tipo western blot, empleando el anticuerpo monoclonal Anti-m3G-cap, m7G-cap, clona H-20 de *EMD Millipore Corporation* a una concentración 1:1000.

5.13 Detección del Cap por North-Western. El RNA total celular o extraído de TLPs fue sometido a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% (PAGE/8 M urea/0.5x TBE) a 20 mA durante 3.5 h. Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond N⁺ (*GE Healthcare*) en una condición semi-seca a 100 mA durante 77 min con buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5 X. Finalizada la transferencia, el RNA se fijó a la membrana con luz UV (*Stratalinker Stratagene*), bajo condiciones preestablecidas del equipo. Posteriormente las membranas fueron procesadas para ensayos tipos Western blot, empleando el anticuerpo Anti-m3G-cap, m7G-cap, clona H-20 de *EMD Millipore* a una concentración 1:1000.

5.14 Ensayos tipo Northern blot. Para el análisis tipo Northern blot, muestras de 500 ng de RNA total fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (PAGE/8 M urea/0.5x TBE) a 20 mA durante 3.5 h. Posteriormente se transfirió el RNA del gel a una membrana de nitrocelulosa Hybond N⁺ (*GE Healthcare*) en una condición semi-seca a 100 mA durante 77 min con buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5 X. Enseguida, el RNA se fijó a la membrana con luz UV (*Stratalinker Stratagene*), bajo las condiciones preestablecidas del equipo. La membrana se prehibridó con solución Ultrahyb-Oligo al menos 1 h a 42°C, a la cual se le agregó un oligonucleótido complementario al gen 10 de RRV con la secuencia: 5'GAGCAATCTTCATGGTTGGAA3', marcado con ³²P, utilizando la enzima T4 Polinucleótido Cinasa (*NEBiolabs*) para hibridar por lo menos 10 horas a 42°C. Posteriormente la membrana

se lavó dos veces con 2XSSC/0.1%SDS durante 30 min a 42°C y se expuso a una pantalla de phosphor Imager. La señal se detectó usando el Typhoon (*Amersham*). A modo de control de carga se empleó la sonda con la secuencia complementaria al rRNA 18 S.

5.15 Ensayo para evaluar la integridad de los RNA ribosomales (rRNA). Para determinar la activación del complejo 2´5-OAS/RNasa L, se evaluó la integridad de los rRNAs después de cada uno de los tratamientos. Para esto el RNA total se aisló con el Kit PureLink RNA Mini Kit (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para analizar las muestras en el BioAnalyzer se empleó el kit “Agilent RNA 6000 Nano Complete Kit with Reagents and Chips” (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada uno de los carriles del chip, cargados previamente con la matriz de corrida y los marcadores correspondientes, se depositó 1 µL del RNA aislado y previamente calentado a 72°C durante 2 minutos. Enseguida el chip se agitó a 2400 rpm durante 1 minuto y se analizó en el Bionalizador 2100 de Agilent (*Santa Clara, CA*), empleando el programa Eukaryote Total RNA Nano, Version 2.6 y se presentan como imágenes parecidos a geles. Para cuantificar la actividad de la RNasa L, se determinó el porcentaje del RNA total que representaba cada uno de los productos de corte de la RNasa L, empleando el mismo programa Eukaryote Total RNA Nano.

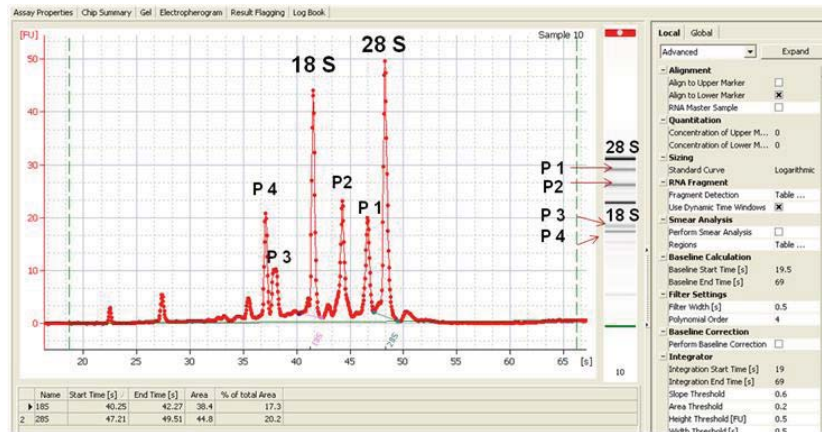


Figura 5.0: Análisis representativo de la cuantificación de los productos de corte de la RNasa L: Para cada una de las muestras analizadas con el Bioanalizador se obtuvo un electroferograma, en donde se identificaron los picos correspondientes a los rRNAs de las subunidades 18S y 28S, así como los productos de corte de la RNasa L (P1, P2, P3 y P4), con ayuda del programa del equipo se determinó el área bajo la curva para cada uno de los picos y se relacionó con la cantidad total del RNA para determinar el porcentaje que cada uno de los picos representa con respecto a la cantidad total de RNA de la muestra en estudio.

VI. RESULTADOS

6.1 La vía antiviral OAS/RNasa L restringe la infección por los rotavirus de la cepa RRV

Dado el potencial antiviral del complejo OAS/RNasa L para restringir las infecciones por virus de RNA y de DNA, se evaluó el efecto de silenciar la expresión de las proteínas RNasa L, OAS1 y OAS3 mediante ensayos de RNA de interferencia (RNAi) en la infección por rotavirus. Para ello, se evaluó la capacidad infecciosa (infectividad) y la producción de progenie viral infecciosa (rendimiento viral) del rotavirus de la cepa RRV en ausencia de dichas proteínas antivirales. En estos ensayos, las células fueron lipofectadas con el siRNA correspondiente. 72 horas después de la transfección se infectaron con RRV a una MOI de 0.02 para medir la infectividad o a una MOI de 3 para la determinación del rendimiento viral. Los resultados se muestran en la Figura 6.0. La eficiencia de los silenciamientos de las proteínas, fue verificada mediante ensayos tipo western blot y son mostradas en la misma figura.

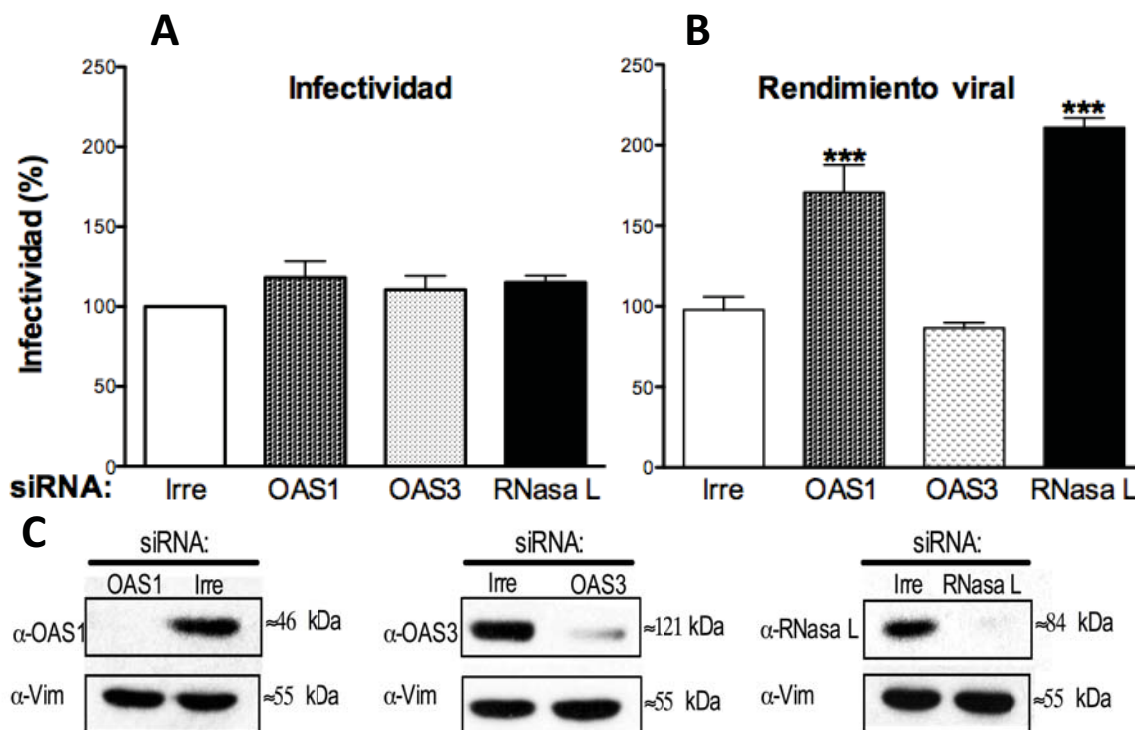


Figura 6.0: Efecto de la ausencia de las proteínas RNasa L, OAS1 y OAS3 en la infectividad (A) y la producción de partículas virales infecciosas (B). Los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de cuatro experimentos independientes por duplicado. Los asteriscos

indican las diferencias significativas entre la infectividad de células tratadas con un siRNA irrelevante y las tratadas con el resto de los siRNAs indicados ($***P \leq 0.001$). El silenciamiento de las proteínas celulares se verificó por western blot (C) y se aprecia que se logró disminuir en todos los casos a las proteínas celulares de interés en por lo menos un 80%. El anticuerpo α -vimentina se usó como control de carga.

Encontramos que al silenciar la expresión de las proteínas celulares en estudio, la infectividad de RRV no se ve afectada, pero en los ensayos de progenie viral encontramos que en ausencia de la RNasa L, la cantidad de virus infeccioso producido se duplicó, comparado con el virus producido en la condición control. En las células con el interferente dirigido a la OAS1, la producción de progenie viral aumentó en más de un 50%. En contraste, el tratamiento con el interferente para la OAS3 no alteró la producción de partículas virales infecciosas.

Los datos que se obtuvieron al cuantificar la producción de virus infeccioso sugieren que el complejo OAS/RNasa L tiene un papel importante en la defensa celular contra la infección con RRV y que la activación de la RNasa L depende principalmente de la actividad de la OAS1 en este modelo experimental.

6.2 Durante la infección con RRV no hay degradación de los RNAs ribosomales

Una vez corroborado el papel antiviral del complejo OAS/RNasa L, decidimos evaluar la activación de este complejo durante la infección con RRV. Hasta la fecha no se cuenta con una metodología que permita evaluar de manera directa tal activación; sin embargo, una de las consecuencias de esta activación es la degradación de RNAs, lo cual puede cuantificarse fácilmente midiendo la integridad de los rRNAs, parámetro por excelencia para determinar la activación de la vía OAS/RNasa L (77).

Para caracterizar la activación de esta vía durante la infección con RRV, monocapas de células MA104 se infectaron o no a una MOI de 10 y se cosecharon a diferentes tiempos después de la infección. Terminado el tiempo de infección se aisló el RNA total para ser examinado en el Bioanalizador, que permite analizar la integridad de los rRNAs. Como control positivo del ensayo se empleó el Poly (I:C), cuya capacidad para inducir la activación del complejo OAS/RNasa L ha sido previamente reportada. Los resultados obtenidos de estos experimentos se muestran en la Figura 6.1, en donde se observa que en el carril

correspondiente a la condición control (células expuestas a la mezcla de lipofección) se encuentran únicamente dos bandas que corresponden a las subunidades 18 y 28 S de los rRNA, mientras que en el carril de las células tratadas con Poly (I:C), además de las bandas 18 y 28 S, se tienen los productos de corte de la RNasa L (señalados con asteriscos). Al analizar los rRNAs en las diferentes condiciones de infección, no se detectó la disminución de éstos, ni los productos de corte de la RNasa L. Estos resultados indican que durante la infección con rotavirus el complejo OAS/RNasa L no está activo.

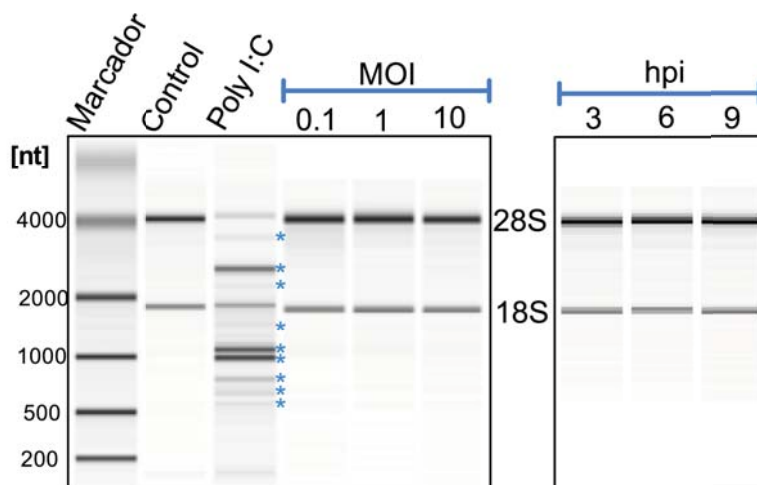


Figura 6.1: Durante la infección con RRV no hay degradación de los rRNAs. Células MA104 fueron infectadas con RRV a las multiplicidades de infección indicadas y cosechadas a las 6 hpi o infectadas a una MOI de 10 y cosechadas a los tiempos indicados. Después de extraer el RNA total de las células, la integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanalizador. Se muestra un resultado representativo de al menos tres ensayos independientes.

6.3 La infección con RRV previene la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA y los 2'5-A

Hasta el momento, hemos encontrado que la vía antiviral OAS/RNasa L es capaz de limitar la infección del rotavirus RRV. No obstante al evaluar de manera indirecta la activación de dicho complejo no encontramos evidencia de que esta vía estuviera activa durante la infección. Esta falta de activación podría ser en parte explicada por: i) el complejo no se activa durante la infección o bien ii) RRV ha desarrollado estrategias para modular este complejo antiviral. Para poder distinguir entre estas dos hipótesis, decidimos evaluar si la infección era capaz de prevenir la degradación de los rRNAs inducida por los 2'5-A y el dsRNA; extraído y purificado

de células infectadas con RRV, cuya capacidad de inducir la activación demostramos previamente en nuestro modelo celular (Figura 6.2).

En estos ensayos se utilizó una misma mezcla para infectar y transfectar, por lo que se verificó previamente que la lipofectamina 2000 no interfiriera con la infección viral y viceversa. Una vez demostrado esto, se infectaron monocapas de células con RRV y al mismo tiempo fueron lipofectadas o no con los 2'5-A o el dsRNA. Las células control, que no fueron infectadas ni tratadas con los 2'5-A o el dsRNA, fueron expuestas a la lipofectamina 2000, para asegurar que este reactivo no interfiriera con la activación de la vía. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 6.2.

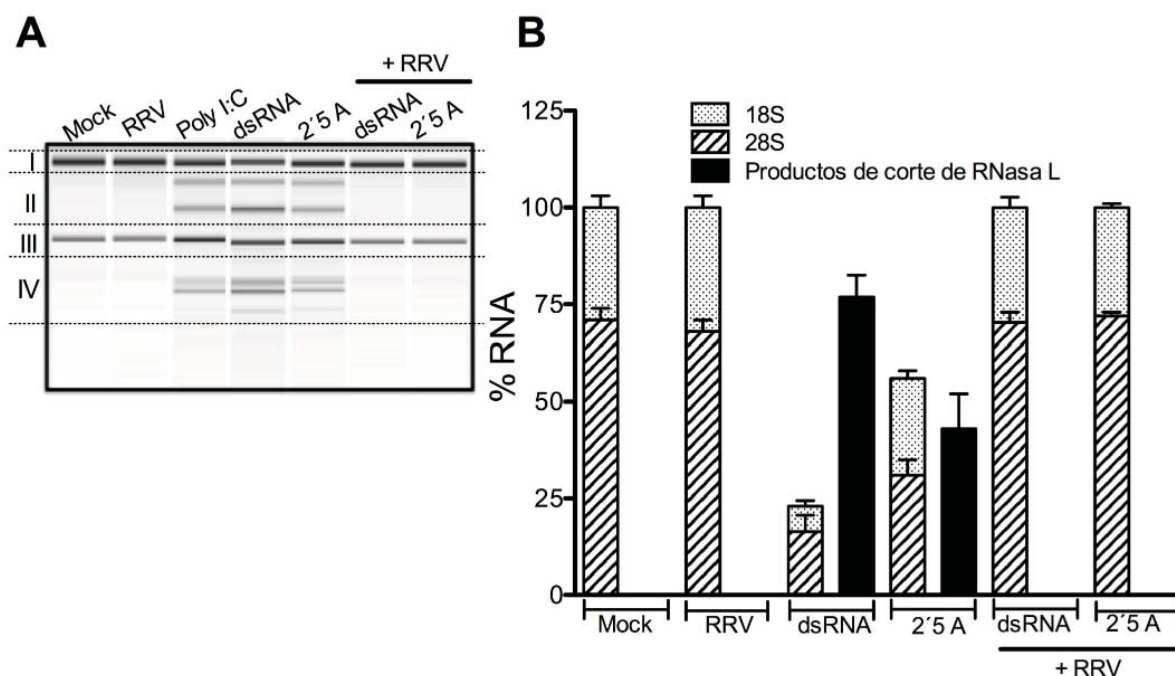


Figura 6.2: La infección con RRV previene la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA y los 2'5-A. A) Células MA104 fueron infectadas o no con RRV a una MOI de 10 y transfectadas o no con 5 µg/mL de Poly (I:C) o con 10 µg/mL de dsRNA o con 2'5-A a una concentración 2.5 µM. A las 9 hpi/t las células fueron lisadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bioanálisis. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. B) Los productos de corte de los rRNAs 28 S y 18 S por la RNasa L, así como los rRNAs fueron cuantificados para cada condición, usando el programa del Bioanálisis, tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Se muestran las medias aritméticas y la desviación estándar de las áreas bajo la curva de las regiones correspondientes (señaladas en A) con números romanos, de tres experimentos independientes.

Encontramos que en la condición control, que consistió en células tratadas con lipofectamina 2000, no se detectó degradación de los rRNAs, mientras que en los carriles correspondientes a las células lipofectadas con Poly (I:C), dsRNA y 2'5-A se observó una clara degradación de los rRNAs, la cual fue prevenida eficientemente en las células que además fueron infectadas con RRV. Estos resultados sugieren que la infección con RRV puede modular la degradación de los rRNA y además encontramos que dicha modulación es posterior a la producción de los 2'5-A.

6.4 La distribución y la cantidad de las proteínas OAS y RNasa L no se modifican durante la infección con RRV

Uno de los mecanismos mejor caracterizados de los rotavirus para prevenir la respuesta antiviral de la célula es la degradación de proteínas celulares mediada por la proteína no-estructural 1 (NSP1) (47), por lo que exploramos si durante la infección con RRV, la RNasa L y/o la OAS1 cambian en cantidad y distribución en las células infectadas mediante ensayos tipo western blot (WB) e inmunofluorescencias (IF). Pese a que los ensayos con los 2'5-A señalan que la modulación del complejo por RRV es un fenómeno que ocurre después de la producción de los 2'5-A, no se descartó el estudio de las OAS para este propósito.

Para estos ensayos, monocapas de células confluentes fueron infectadas o no con RRV a una MOI de 10 y cosechadas a los tiempos 3, 6, 9 y 12 hpi para ser procesadas por WB, o cosechadas a las 6 hpi para ser procesadas por IF. Los ensayos por WB revelaron que durante la infección con RRV ni la cantidad de RNasa L ni de la de OAS1 se modifican, lo que permite descartar que la degradación de dichas proteínas sea el mecanismo por el cual los rotavirus controlan la vía antiviral OAS/RNasa L (datos no mostrados).

Al analizar la distribución intracelular de las proteínas OAS1 y RNasa L por ensayos de inmunofluorescencia, encontramos que durante la infección con RRV no hay un cambio significativo en la localización de estas proteínas comparadas con su distribución en células no infectadas (Figura 6.3).

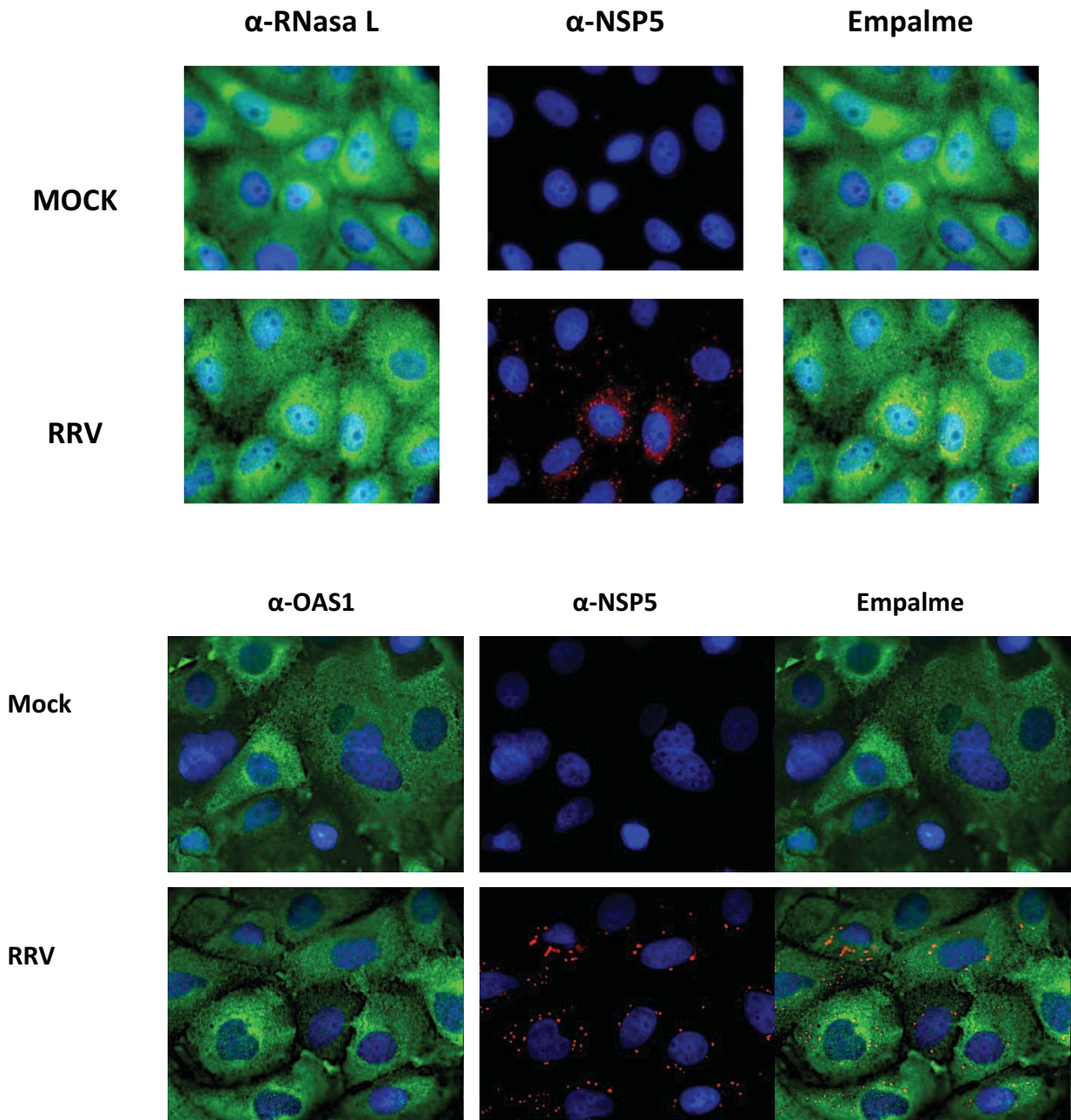


Figura 6.3: Localización celular de la RNasa L y la OAS1. Células MA104 fueron infectadas a o no con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 10 y analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales para detectar a la RNasa L y a la OAS1 (señales en verde). La distribución de NSP5 (empleado como marcador de viroplasmos) en las células infectadas, fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Amplificación 100X.

6.5 La cantidad del inhibidor de la RNasa L no se modifica durante la infección con RRV

El inhibidor de la RNasa L (IRL) es una proteína presente en el citoplasma y la mitocondria de casi todas las células animales, tiene una masa molecular de 68 kDa y su expresión no está regulada por los IFN. Esta proteína regula el recambio de los mRNAs, pero su función mejor caracterizada es como regulador de la vía OAS/RNasa L. El IRL se une a la RNasa L dando lugar a los heterodímeros inactivos IRL/RNasa L, de esta forma previene la formación de los dímeros de la RNasa L. Se ha descrito que algunos virus, como el virus de la encefalomiocarditis y el HIV-1, son capaces de aumentar la expresión del IRL como mecanismo antagónico de la vía OAS/RNasa L ([32](#), [34](#), [78](#)).

Durante la infección con RRV hemos encontrado que hay dsRNA expuesto en el citoplasma de las células infectadas, el cual se ha reportado como un potente inductor de dicho inhibidor ([78](#)). La falta de actividad de este complejo antiviral durante la infección con RRV, aún en presencia de los 2'5-A sugería que la modulación de este complejo podría estar a nivel de la RNasa L y posiblemente mediada por el IRL. Por este motivo exploramos si durante la infección con RV se modificaba la cantidad y/o la localización subcelular del IRL. Para ello, monocapas de células MA104 fueron infectadas o no con RRV durante 6 horas y procesadas para inmunofluorescencia o bien para Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal ABCE1 que reconoce al IRL. Como se muestra en las Figuras 6.4 y 6.5, la localización subcelular del IRL no se alteró durante la infección con rotavirus y la cantidad de esta proteína celular no aumentó durante la infección, lo que sugiere que el inhibidor endógeno de la RNasa L no participa directamente en la modulación de la vía OAS/RNasa L durante la infección con RRV.

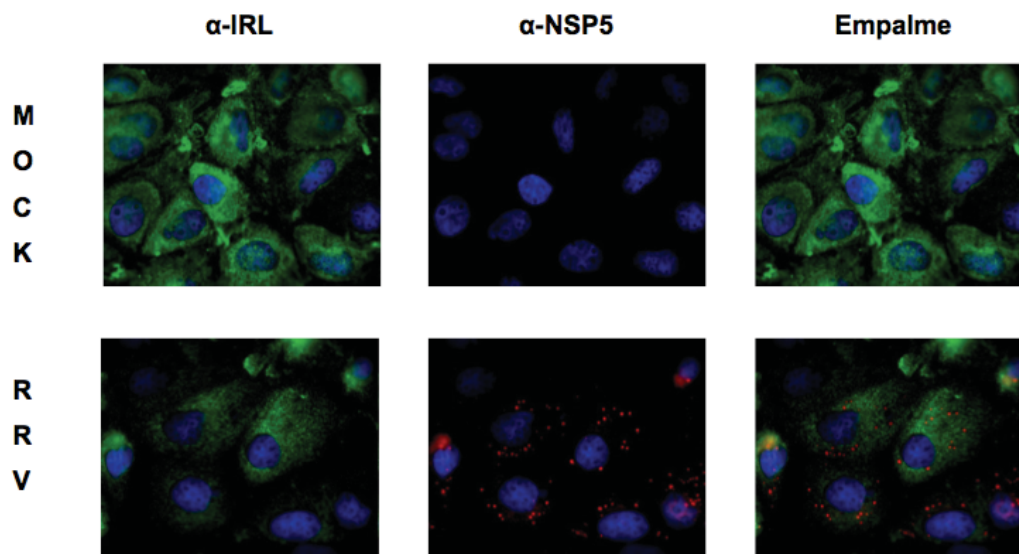


Figura 6.4: Localización celular del IRL. Células MA104 fueron infectadas a o no con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 10 y analizadas por inmunofluorescencia. Se empleó un anticuerpo monoclonal para detectar al IRL (señal en verde). La distribución de NSP5; empleado como marcador de viroplasmas, en las células infectadas fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5 (en rojo). Los núcleos fueron detectados con DAPI (azul). Amplificación 100X.

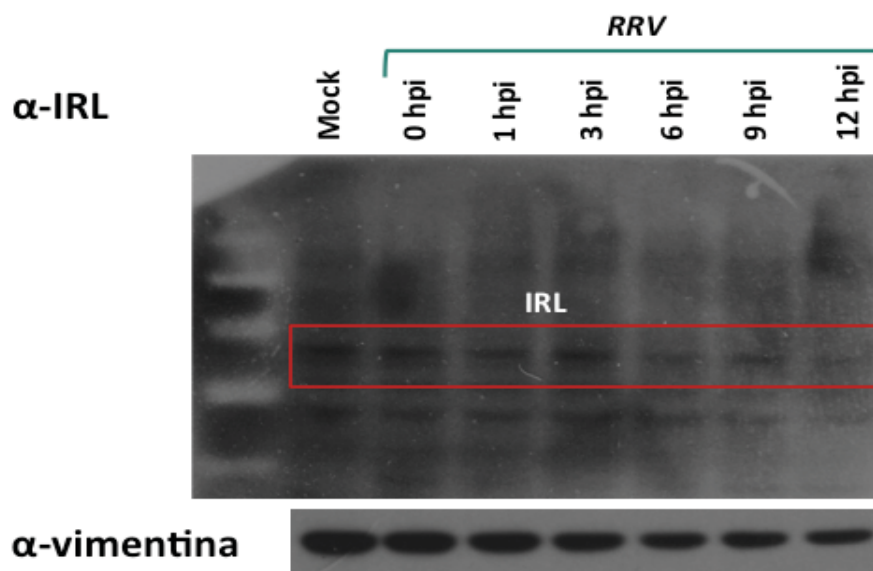


Figura 6.5: Expresión del IRL. Células MA104 fueron infectadas o no con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 10 durante los tiempos indicados, para ser procesadas para western blot. Se empleó un anticuerpo monoclonal para detectar al IRL (señalado con el recuadro en rojo), como control de carga se empleó el anticuerpo α -vimentina.

6.6 Las proteínas de la capa externa VP4 y/o VP7 están involucradas en la modulación de la vía OAS/RNasa L

Uno de los objetivos de este proyecto fue el caracterizar los eventos o componentes virales involucrados en la modulación de la vía OAS/RNasa L, por lo que una vez que descartamos que la distribución y/o la cantidad de las proteínas OAS, RNasa L así como el IRL tienen un papel directo en este control, decidimos explorar si durante el proceso de entrada o como consecuencia de éste, los rotavirus pueden tomar el control de dicha vía. Para este propósito, estudiamos el efecto de la transfección de partículas de doble capa (DLPs) sobre la degradación de los rRNAs. Las DLPs son partículas virales transcripcionalmente activas, pero al carecer de la capa proteica más externa del virus, compuesta por VP4 y VP7, son incapaces de unirse y entrar a su célula huésped, de ahí la necesidad de introducir las por lipofección. Sin embargo, una vez dentro de la célula, las DLPs son capaces de completar su ciclo infeccioso. Por lo tanto, el ensayo con DLPs nos permite evaluar el efecto de la ausencia de las proteínas VP4 y VP7, así como del proceso de entrada, sobre la modulación de la vía OAS/RNasa L. En estos ensayos, las células se infectan o lipofectan con una cantidad determinada de TLPs o DLPs para tener una MOI de 10 o equivalente a 10, respectivamente, y se evalúa la integridad de los rRNAs en estas condiciones a diferentes tiempos post infección. Al infectar o lipofectar células con TLPs, no se observó degradación de rRNAs, pero para nuestra sorpresa encontramos que la transfección de DLPs indujo la degradación de rRNAs (Figura 6.6). Este resultado sugiere que la modulación de la vía OAS/RNasa L podría estar mediada por alguno de los componentes presentes en la capa más externa de la partícula viral; en cuya ausencia, como ocurre cuando se lipofectan las DLPs, la vía antiviral se activa. Alternativamente, estos ensayos también sugieren que el proceso de entrada (que se evita al transfectar DLPs), podría ser la etapa en donde el virus previene la activación de dicho mecanismo antiviral.

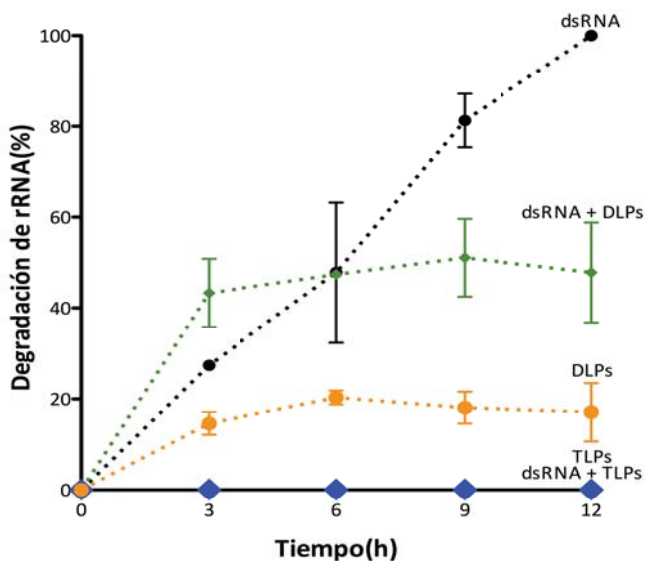


Figura 6.6: Efecto de la infección de DLPs sobre la degradación de los rRNAs. Células MA104 fueron infectadas o no con TLPs purificadas a una MOI de 10 o transfectadas con DLPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), al mismo tiempo fueron transfectadas o no con el dsRNA. A los tiempos indicados, las células fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas, usando el software del Bionalizador. Las medias aritméticas \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes son mostrados.

En la Figura 6.6 se observa que la infección con DLPs indujo la degradación de los rRNAs, desde las 3 hpt, pero en la misma figura podemos apreciar que entre las 3-6 hpt se alcanzó la máxima degradación de los rRNAs. Pese a que la infección continuó hasta las 12 h, la cantidad de rRNA degradado no aumentó conforme la infección transcurrió, lo que sugiere que, si bien las DLPs carecen de la capa externa y con ello de la capacidad de controlar la vía OAS/RNasa L desde el proceso de entrada, estas partículas son capaces de modular este complejo antiviral en tiempos tardíos de la infección y que al parecer, su actividad transcripcional está involucrada en dicho control. Para corroborar esta capacidad moduladora tardía, se transfectaron TLPs y DLPs en combinación con dsRNA. Como lo habíamos observado empleando lisados virales totales, encontramos que la infección con las partículas completas previene de manera muy eficiente la degradación de los rRNAs inducida por dsRNA. En la condición en donde las células fueron lipofectadas con DLPs y dsRNA al mismo tiempo, encontramos que en tiempos tempranos de la infección (que definiremos antes de las 6 hpi/t) la degradación de los rRNA fue mayor que la observada en las células tratadas sólo con dsRNA, pero de manera similar a la condición de células transfectadas sólo

con DLPs, entre las 3-6 hpt se alcanzó la máxima degradación de los rRNA. Estos resultados evidencian que las proteínas de la capa externa están involucradas en la modulación de la vía OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección, las cuales permiten a las TLPs contender incluso con la degradación de los rRNAs inducida por dsRNA, fenómeno no observado con DLPs. En el lapso comprendido entre las 3-6 hpi/t se alcanzó la máxima degradación de los rRNAs en la condición DLPs + dsRNA, lo cual evidencia la capacidad moduladora sobre la vía OAS/RNasa L de las DLPs. Sabemos que en células infectadas con RRV desde las 3 hpi se encuentran dsRNA y mensajeros virales (79), ensayos por WB e incorporación de marca también han revelado la presencia de proteínas virales desde las 3 hpi.

Con base en estas observaciones consideramos que si bien las proteínas de la capa externa son responsables de modular la vía OAS/RNasa L, es requerida la síntesis *de novo* de algún componente viral (de naturaleza proteica o algún ácido nucleico) para que RRV controle dicha vía, puesto que las DLPs que carecen de la capa externa conformada por VP4 y VP7, pero que son capaces de transcribir, replicar y dirigir la síntesis de las proteínas virales, controlaron la respuesta de dicha vía ya que después de las 6 hpi la cantidad de rRNA degradado no se incrementó. Incluso estas partículas fueron capaces de controlar la degradación de rRNAs inducida por dsRNA (Figura 6.6).

6.7 El componente viral que modula la vía OAS/RNasa L forma parte de la partícula viral, pero es requerida la transcripción viral para un control eficiente

Para confirmar los datos anteriores en los que observamos que el o los componentes virales que impiden la activación del complejo OAS/RNasa L forman parte de la partícula viral entrante y/o es necesaria su síntesis en la célula infectada, empleamos virus RRV inactivado (iRRV) con psoralen y luz UV. Éste tratamiento genera enlaces covalentes entre las cadenas del RNA viral. El virus conserva la capacidad de unirse a sus receptores celulares y entrar en su célula hospedera, pero es incapaz de iniciar la transcripción viral (76). La inactivación del virus se verificó cuantificando la disminución del título viral por ensayos de inmunoperoxidasa y mediante ensayos de incorporación de S^{35} , en los que se corroboró que

en las células infectadas con el iRRV no hay síntesis de proteínas virales (datos no mostrados). También se realizaron ensayos de hemaglutinación para confirmar que el tratamiento de inactivación no afectara las proteínas involucradas en el proceso de entrada y unión a la célula. Encontramos que en las células infectadas con el virus inactivado, los rRNAs no se degradaron, sin embargo, en presencia de dsRNA o con 2´5-A, el virus inactivado fue capaz de prevenir la degradación de los rRNAs en tiempos tempranos de la infección (hasta las 3 hpi). Sin embargo a las 6 hpi, el dsRNA fue capaz de inducir la degradación de los rRNAs (Figura 6.7).

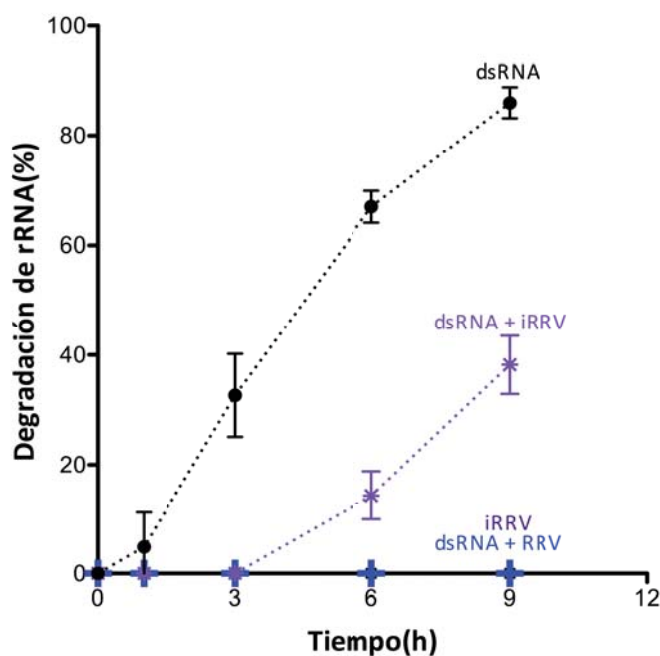


Figura 6.7: Efecto de la infección de virus inactivado (iRRV) sobre la integridad de los rRNAs. Células MA104 fueron infectadas o no con iRRV o RRV a una MOI de 10, al mismo tiempo fueron transfectadas o no con el dsRNA. A los tiempos indicados, las células fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas usando el software del equipo. Las medias aritméticas \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes son mostrados.

En conjunto, todos los resultados obtenidos sugieren que la modulación de la vía antiviral OAS/RNasa L es un evento multifactorial que podría ocurrir en al menos dos etapas; la primera, en tiempos tempranos de la infección, donde al parecer las proteínas que forman parte de la partícula viral entrante son suficientes para inhibir la activación de dicha vía y la segunda, en tiempos tardíos de la infección en donde se requiere la síntesis *de novo* de algún

componente viral, para mantener inactiva esta vía antiviral de forma eficiente. Esta última hipótesis se ve reforzada por los resultados obtenidos con el virus inactivado (iRRV), el cual es capaz de controlar el complejo antiviral en tiempos tempranos de la infección, pero tal capacidad se pierde conforme avanza la infección.

A continuación se describen los resultados referentes a la caracterización del o los componentes virales involucrados en la modulación del complejo antiviral en tiempos tempranos y tardíos de la infección.

IDENTIFICACIÓN DEL O LOS COMPONENTES DE LOS ROTAVIRUS DE LA CEPA RRV INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIVIRAL RNasa L EN LA LÍNEA CELULAR MA104 EN TIEMPOS TEMPRANOS DE LA INFECCIÓN.

Los resultados obtenidos previamente sugerían que las proteínas de la capa externa, VP4 o VP7, están involucradas en la modulación de la vía OAS/RNasa L directa o indirectamente. Nuestra hipótesis inicial consideraba la interacción directa de estas proteínas de capa externa con algún componente de la vía OAS/RNasa L, como se ha descrito para algunos picornavirus (80), o mediante la activación de una vía de señalización que induzca un estado de anergia en las células, como se ha descrito para algunos otros virus (81). Para discernir cual de estas proteínas de capa externa era la responsable de la vía OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección, evaluamos el efecto de la ausencia de VP4 en el control de la vía OAS/RNasa L.

6.8 La proteína VP4 está implicada en la modulación de la vía OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección.

Para evaluar el efecto de la ausencia de VP4 sobre la inhibición de la RNasa L, preparamos partículas de tres capas carentes de VP4 (a las que les llamamos *Spikeless*; SIPs), empleando siRNAs dirigidos contra la VP4 de RRV, de acuerdo al protocolo descrito por Dector y colaboradores (82). De manera resumida, el siRNA dirigido a la VP4 de RRV se lipofectó en células MA104 y 72 horas post tranfección las células fueron infectadas con RRV durante 12

horas. Las partículas virales obtenidas de este ensayo fueron purificadas mediante centrifugación isopícnica (*Espejo RT, et al. 1981*). Al término de la centrifugación, se observaron bajo la luz blanca dos bandas opalescentes, que corresponden a las partículas TLPs y DLPs producidas en ausencia del siRNA, mientras que las partículas ensambladas en presencia del siRNA VP4 se observaron en dos bandas discretas correspondientes a las TLPs y DLPs, además una tercer banda mucho más robusta que de acuerdo a *Dector, et al. 2002*, corresponde a las SIPs, tal como se muestra en la Figura 6.8.

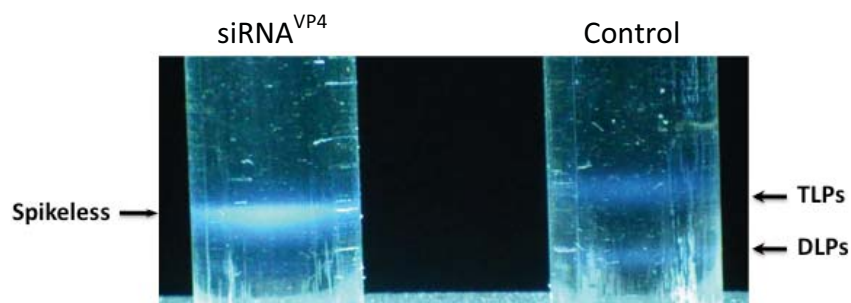


Figura 6.8: Gradientes isopínicos de CsCl de las partículas virales de RRV ensambladas en ausencia o presencia del siRNA dirigido a la VP4 de RRV. Células MA104 fueron lipofectadas o no con el siRNA dirigido a la VP4 de RRV, 12 hpi los lisados celulares fueron cosechados y las partículas virales se purificaron mediante gradientes de CsCl. Una imagen representativa de tres experimentos independientes es mostrada.

Las partículas en el gradiente fueron recolectadas mediante punción de cada una de las bandas; cada una de éstas (correspondientes a TLPs, DLPs y SIPs) se desalaron con la resina Sephadex G-25 para analizar posteriormente su perfil proteico mediante SDS-PAGE y tinción con plata (Figura 6.9). Estas tinciones revelaron que las fracciones correspondientes a las TLPs contenían a las proteínas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7, mientras que en las fracciones de las bandas de las DLPs encontramos a las proteínas VP1, VP2 y VP6. Para las SIPs, se encontró que tienen las mismas proteínas que las TLPs a excepción de la VP4 y VP5. En todos los casos los perfiles proteicos encontrados para las TLPs, DLPs y SIPs corresponde al ya reportado previamente (Figura 6.9).

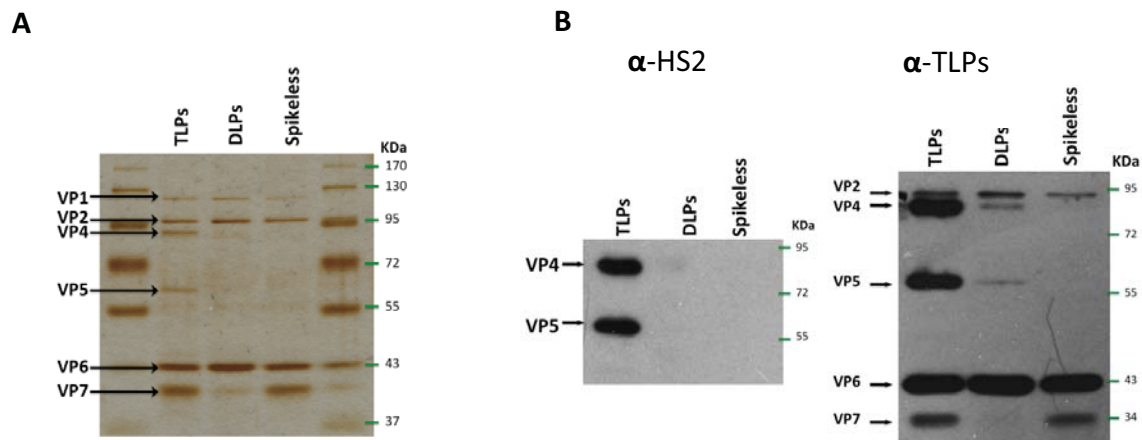


Figura 6.9: Perfil proteico de las bandas correspondientes a las TLPs, DLPs y Spikeless obtenidas por gradientes isopícnicos de CsCl, desaladas y teñidas con plata (A) o procesadas para Western blot (B). Se empleó un anticuerpo monoclonal para detectar a la VP5 (HS2), a manera de control de carga, el anticuerpo α -TLPs fue empleado. Cada una de las proteínas virales es señalada en la imagen. *El tratamiento de la VP4 con tripsina produce tres cortes muy cercanos en la proteína (aa R231, R241 y R247), generando dos productos principales de la hidrólisis. Uno de estos productos es el polipéptido VP8 de 231 aa, con un peso molecular de 28 KDa y localizado hacia el extremo amino terminal de VP4. El otro producto es el polipéptido VP5, formado por 528 aa con un peso molecular de 60 KDa y localizado hacia el extremo carboxilo terminal de VP4.

Para corroborar la ausencia de VP4 en las SIPs, se realizaron ensayos tipo Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal HS2 que detecta a la proteína VP5* (Padilla-Noriega, *et al.* 1993). Encontramos que la fracción que contiene a la VP4 es la de las TLPs, en donde se pueden apreciar dos bandas que corresponden a la VP4 y a la VP5. Para el caso de las fracciones correspondientes a las DLPs, encontramos en algunos casos dos bandas discretas que corresponden a la VP4 y la VP5, mientras que para las SIPs no se pudo detectar la presencia de la proteína VP4 ni VP5 con este anticuerpo. Para asegurarnos de que cantidades similares de proteína total se cargaron en los carriles de TLPs, DLPs y SIPs, las membranas tratadas con el anticuerpo HS2, fueron posteriormente incubadas con el anticuerpo α -TLPs; que reconoce proteínas estructurales de RRV (ver Figura 6.9 B).

Después de confirmar la composición proteica de las SIPs generadas, procedimos a evaluar si estas partículas eran infecciosas, mediante ensayos de inmunoperoxidasa. Dado que las SIPs carecen de la VP4, que es la proteína indispensable para que el virus entre en su célula huésped, fue necesario el uso de liposomas para introducirlas en las células.

A manera de control, se empleó la mayor cantidad de proteína usada en ausencia de lipofectamina, para evaluar la posible contaminación con TLPs. En la Figura 6.10, se muestran

fotografías representativas de monocapas celulares lipofectadas con diferentes cantidades de SIPs y posteriormente procesadas por inmunoperoxidasa. La presencia de precipitados en color rojo-marrón evidencia la presencia de proteínas virales, lo que demuestra que la célula fue infectada y que en ella se llevó a cabo la síntesis de proteínas virales.

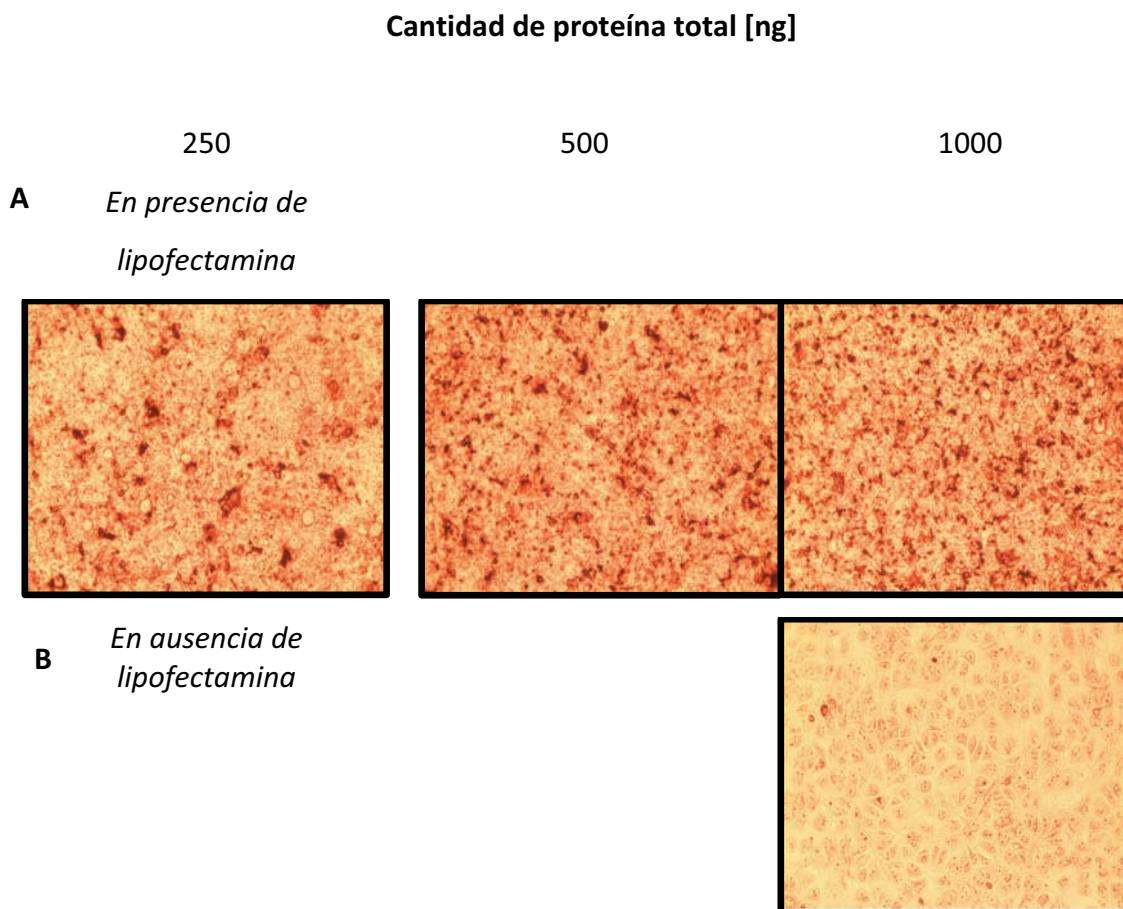


Figura 6.10: Evaluación de la infectividad de las Spikeless. Células MA104 fueron expuestas a una mezcla lipofectamina + SIPs a las concentraciones indicadas (A) o sólo a SIPs (B). 14 hpt las células fueron procesadas para inmunoperoxidasa. La imagen muestra fotografías representativas de monocapas celulares que recibieron los tratamientos indicados.

Con estos ensayos de infectividad se determinó que la concentración óptima de SIPs para evaluar la integridad de los rRNA, es de 500 ng por pozo de 48. Adicionalmente, se evaluó la producción de progenie viral y la síntesis de proteínas virales obtenidas al tranfectar 500 ng de SIPs (datos no mostrados). Con estos ensayos corroboramos que las SIPs obtenidas eran

infecciosas, su lipofección resulta en la producción de proteínas virales y progenie viral infecciosa.

Para evaluar el efecto de la infección con estas partículas carentes de VP4 sobre el complejo OAS/RNasa L, éstas se lipofectaron en MA104 y 6 h post transfección, se extrajo el RNA y se analizó en el Bionalizador. Como se observa en la Figura 6.11, la transfección con SIPs (500 o 1000 ng) indujo la degradación de los rRNAs, que es el mismo comportamiento que se había observado con las DLPs, que fueron usadas en estos ensayos como control.

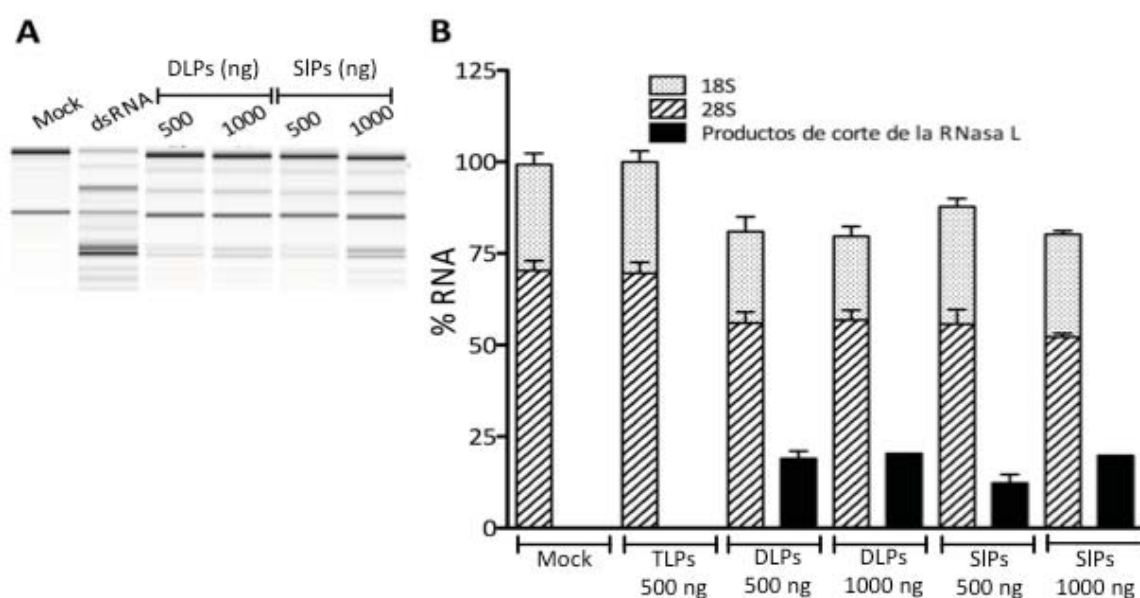


Figura 6.11: Efecto de la infección con SIPs sobre la integridad de los rRNAs. Células MA104 fueron lipofectadas con TLPs, DLPs o SIPs a las concentraciones indicadas en la figura. Seis hpt, el RNA total fue purificado y analizado. Imagen de un ensayo representativo (A). Cuantificación de los productos de corte de la RNasa L inducido por diferentes tipos de partículas virales (B).

De manera similar a la caracterización realizada con la infección de las DLPs sobre la degradación de los rRNAs, evaluamos a diferentes tiempos post infección la degradación de los rRNAs inducida por la infección con las SIPs y su capacidad para poder modular o no la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA. Encontramos que los productos de corte de la RNasa L generados durante la infección con SIPs alcanzaron su máximo entre las 3-6 hpt, y aunque la infección continua, ya no hay más degradación de los rRNAs (ver Figura 6.12).

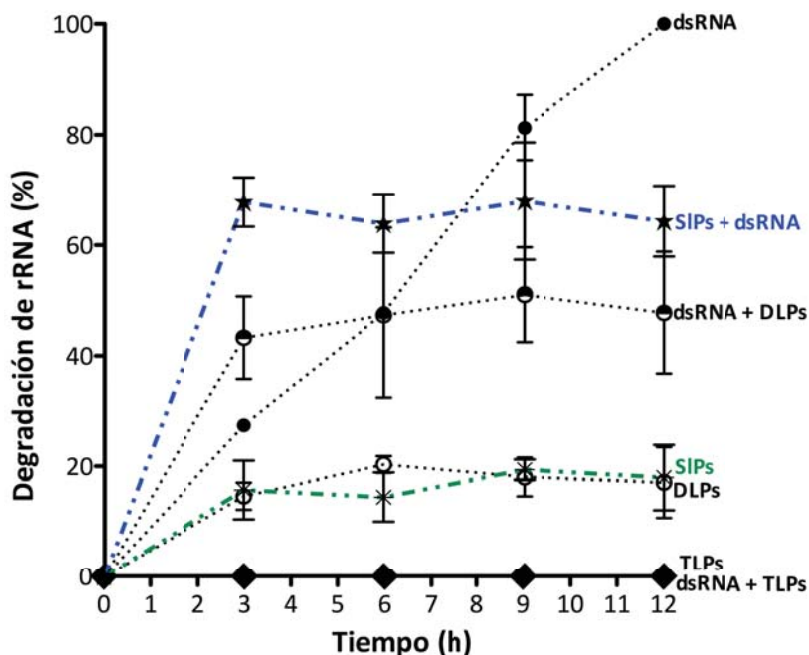


Figura 6.12: Efecto de la infección de TLPs, DLPs y SIPs sobre la integridad de los rRNAs a diferentes tiempos post infección en ausencia o presencia de dsRNA. Células MA104 fueron infectadas o no con TLPs purificadas a una MOI de 10 o transfectadas con DLPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o SIPs (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), al mismo tiempo fueron transfectadas o no con el dsRNA. A los tiempos indicados en la figura, las células fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas, usando el software del equipo. Las medias aritméticas \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes son mostrados.

Con estos ensayos encontramos que tanto la infección con SIPs como con DLPs inducen la activación de la RNasa L, este fenómeno no lo observamos durante la infección con TLPs. Al igual que las DLPs, las SIPs controlaron la degradación que induce el dsRNA en tiempos tardíos de la infección. Es de particular importancia resaltar que tanto en las SIPs como en las DLPs, la VP4 está ausente, por lo que en conjunto, estos resultados podrían sugerir que la VP4 está involucrada en la modulación de la RNasa L durante los tiempos tempranos de la infección. Además, con ambos tipos de partículas virales se evade el proceso de entrada a la célula, sugiriendo que las proteínas de la capa externa, o el proceso de entrada del virus a la célula participan en la regulación inicial de la vía OAS/RNasa L.

6.9 Durante las primeras etapas del ciclo infeccioso los rotavirus toman el control de la vía OAS/RNasa L

Para la entrada del virus de la cepa RRV a su célula hospedera se requiere de varios pasos. Al ser activada con tripsina, la proteína VP4 se corta específicamente en dos polipéptidos: VP5 y VP8. Una vez activado el virus, se une a su célula blanco a través del reconocimiento de receptores presentes en la superficie celular. Se sabe que para los rotavirus de la cepa RRV, el ácido siálico, las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_x\beta_2$ y $\alpha_4\beta_1$ así como la proteína de choque térmico Hsc70 están involucradas como sus receptores y que estas interacciones además son secuenciales (17). En la siguiente figura se resumen los primeros pasos de la infección de la cepa RRV propuestos hasta la fecha.

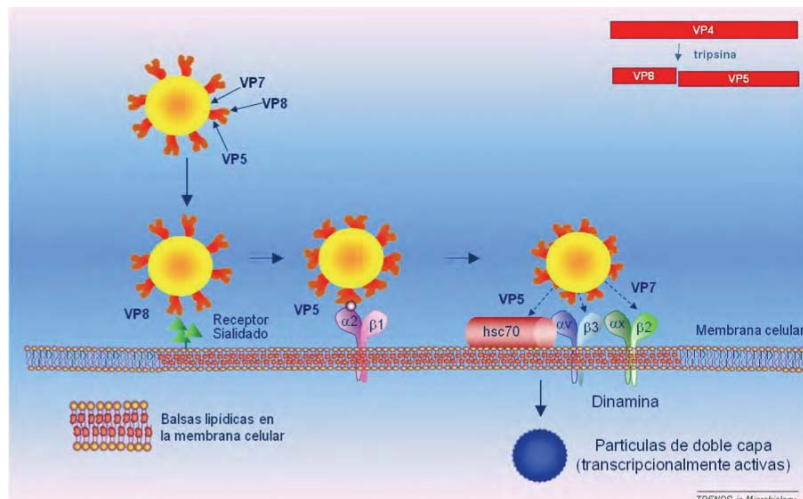


Figura 6.13: Primeras etapas de la infección con RRV. Los rotavirus de la cepa RRV requieren de un procesamiento proteolítico para ser infecciosos. Una vez procesada la proteína VP4, el virus se une específicamente a sus receptores celulares, la unión a los receptores celulares provoca cambios conformacionales en la partícula que facilitan la entrada del virus. Modificada de (17).

6.9.1 Ensayos con neuraminidasa

Los resultados anteriores sugerían que durante o como consecuencia del proceso de entrada, los rotavirus inhiben a la RNasa L. Con la finalidad de estudiar en detalle si durante las primeras interacciones del virus con su célula se dispara algún mecanismo modulador de la RNasa L, decidimos remover el ácido siálico de la superficie de las células mediante un tratamiento con neuraminidasa (NA). Los ácidos siálicos terminales son importantes en las

primeras interacciones del virus con la célula (17). No obstante, en las células que recibieron el tratamiento con NA, fue imposible lipofectar el dsRNA, por lo cual no se pudo determinar si en estas condiciones, RRV aún es capaz de prevenir la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA. La transfección de dsRNA a través del sistema Magnet Assisted Transfection (MATra) también fue probada para estos fines, pero sin resultados satisfactorios, puesto que la cantidad de RNA total aislado de células que fueron transfectadas con este método fueron tan bajas que impidió el análisis de la integridad de los rRNAs por electroforesis capilar (datos no mostrados).

6.9.2 Ensayos con anticuerpos neutralizantes

Como alternativa para discernir en que punto del proceso de la entrada se inicia el control de la vía OAS/RNasa L, se utilizaron anticuerpos neutralizantes dirigidos contra RRV, cuyo antígeno y mecanismo de acción para neutralizar al virus son conocidos. Los anticuerpos empleados para estos ensayos así como algunas características de interés se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.0: Características de los anticuerpos neutralizantes 159,255 y 2G4.

Anticuerpo	Proteína contra la que está dirigido	Características	Aminoácido al que se une
159	VP7	-Anticuerpo neutralizante -No inhibe la unión de RRV	94
255	VP6	-Anticuerpo NO neutralizante -No inhibe el pegado de RRV	172
2G4	VP5	-Anticuerpo neutralizante -No inhibe la unión a la célula de RRV -Inhibe la hemaglutinación	393

El anticuerpo 159, dirigido contra la proteína VP7, no interfiere con la unión ni entrada del virus a su célula huésped, previene el desensamble de los trímeros de VP7 en el endosoma de la célula, de ahí su capacidad neutralizante (83). Empleando este anticuerpo se pudo evaluar si RRV controla el complejo OAS/RNasa L antes o después de la entrada del virus al citoplasma celular. Se ha descrito que la capacidad neutralizante del anticuerpo 2G4, dirigido contra VP4, reside en bloquear las interacciones posteriores a la interacción del virus con el ácido siálico y que podría incluir o no la interacción con las integrinas o la proteína Hcs70 (84). El anticuerpo 255, que reconoce a la proteína VP6 y que carece de actividad

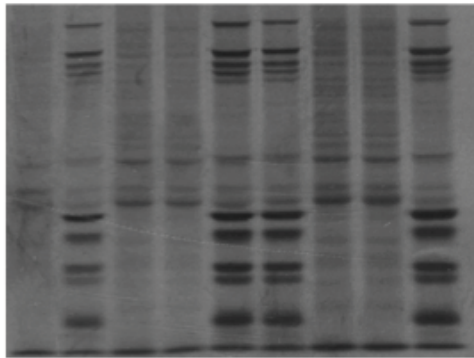
neutralizante, se utilizó como control para descartar que los efectos observados con los anticuerpos 159 y 2G4 fueran consecuencia de eventos inespecíficos. Para estos ensayos, estandarizamos previamente las condiciones con respecto al tiempo y la concentración de los anticuerpos 159 y 2G4 para neutralizar la infectividad de RRV.

De manera simultánea a la infección, se lipofectaron 500 ng de dsRNA a las células o se trataron únicamente con lipofectamina 2000. A diferentes tiempos después de la infección, las células fueron cosechadas para determinar la integridad de los rRNAs o lisadas para evaluar la incorporación de S^{35} , con la finalidad de estimar la eficiencia de los anticuerpos de neutralizar la infección por RRV. Los resultados se muestran en la Figura 6.14.

A)

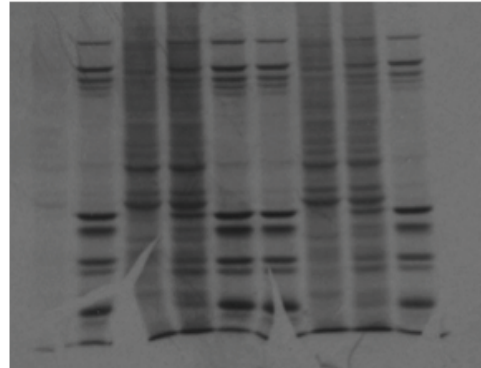
3hpi/t

RNAde	+	-	-	-	-	+	+	+	+
RRV	-	+	+	+	+	+	+	+	+
159	-	-	+	-	-	-	+	-	-
2G4	-	-	-	+	-	-	-	+	-
255	-	-	-	-	+	-	-	-	+



6hpi/t

RNAde	+	-	-	-	-	+	+	+	+
RRV	-	+	+	+	+	+	+	+	+
159	-	-	+	-	-	-	+	-	-
2G4	-	-	-	+	-	-	-	+	-
255	-	-	-	-	+	-	-	-	+



B)

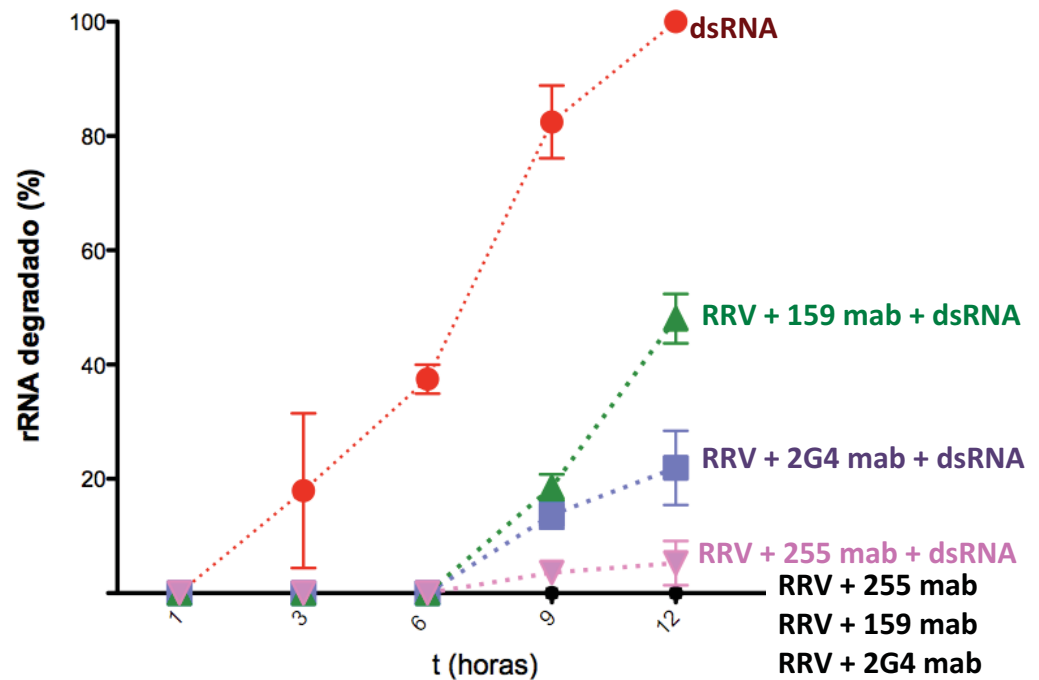


Figura 6.14: Efecto de los anticuerpos neutralizantes en el control de RRV sobre la vía OAS/RNasa L. Células MA104 recibieron el tratamiento indicado. 2.5 y 5.5 hpi las células fueron marcadas durante 30 min con ^{35}S y posteriormente lisadas. Las proteínas marcadas se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se detectaron por autorradiografía, con la finalidad de estimar la eficiencia de los anticuerpos de neutralizar la infección por RRV. (A). En paralelo, las células que recibieron los tratamientos indicados fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas. Las medias aritméticas \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes son mostrados (B).

Como se observa en la Figura 6.14 A, las autorradiografías demuestran la eficiencia de los anticuerpos 159 y 2G4 para prevenir la infección evaluados a las 3 y 6 hpi. En los carriles en los que se trató el lisado con el anticuerpo 159, tanto en ausencia como en presencia de dsRNA, no se detectó la síntesis de proteínas virales, lo que evidencia la eficiencia de este anticuerpo de neutralizar la infección. Encontramos que a las 6 hpi, el anticuerpo 2G4 no neutralizó tan eficientemente la infección como el anticuerpo 159. Se observó que aún en presencia del anticuerpo 2G4, se produce una discreta cantidad de proteínas virales. Por el contrario, en las células infectadas con el lisado tratado con el anticuerpo 255 (que no tiene actividad neutralizante), se observa la síntesis de proteínas virales de manera similar a aquellas células que fueron infectadas con lisados no tratados con anticuerpos. De igual manera, en las autorradiografías se observa la inhibición en la síntesis de proteínas que induce el dsRNA, pero incluso la infección con virus neutralizado previene tal efecto.

En la Figura 6.14 B, se observa que durante la infección con el virus tratado con los diferentes anticuerpos no se induce la degradación de los rRNAs, como lo observado durante la infección con RRV. Sin embargo, al añadir dsRNA a la infección con los virus tratados con anticuerpos, encontramos que por lo menos hasta las tres horas post infección, los virus neutralizados pueden prevenir la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA.

Dado que se conocen los mecanismos de acción de los anticuerpos 159 y 2G4, podemos especular cuales son las interacciones mínimas necesarias para que RRV tome control de la vía OAS/RNasa L. Mediante el anticuerpo 159 podemos descartar que el control de la vía sucede después del desensamble de VP7. Por otra parte, a pesar de que el anticuerpo 2G4 (dirigido contra VP5) no bloquea la unión del virus a la superficie de la célula, sí es capaz de neutralizar la infectividad de este virus. Esto sugiere que después de que RRV se une a un receptor sensible a NA a través de VP8, ocurre una segunda interacción (facilitada por el primer contacto) mediada por VP5, esta segunda interacción es bloqueada por el anticuerpo 2G4. Dado que en esta segunda interacción están involucradas las integrinas y la proteína de choque térmico Hsc70, los datos con los anticuerpos neutralizantes nos sugieren que posiblemente la interacción con alguna de estas proteínas es la responsable de inhibir la vía OAS/RNasa L en las etapas iniciales de la infección.

6.9.3 Ensayos con rotavirus que tienen diferentes requerimientos de receptores

Como se mencionó en la introducción, existen cepas de rotavirus que tienen diferentes requerimientos de receptores, lo que define su vía de entrada a la célula (Tabla 1.1). Para determinar si la interacción de alguno de estos receptores con las proteínas virales de la capa externa era la responsable de modular el complejo OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección, se evaluó si cepas con diferentes requerimientos de receptor eran capaces de modular o no dicha vía antiviral, como hemos observado con la cepa RRV. De particular interés fue estudiar a la cepa bovina UK que, además de tener diferencias en sus requerimientos de entrada, existen evidencias de que su capacidad para modular la respuesta celular es menos eficiente que la observada para la cepa RRV (4, 14).

Para estos ensayos, las células fueron infectadas con las cepas RRV, UK o Nar3 solas o en combinación con dsRNA. A diferentes tiempos post infección, las células se cosecharon para evaluar la integridad de los rRNAs. Los resultados se muestran en la Figura 6.15.

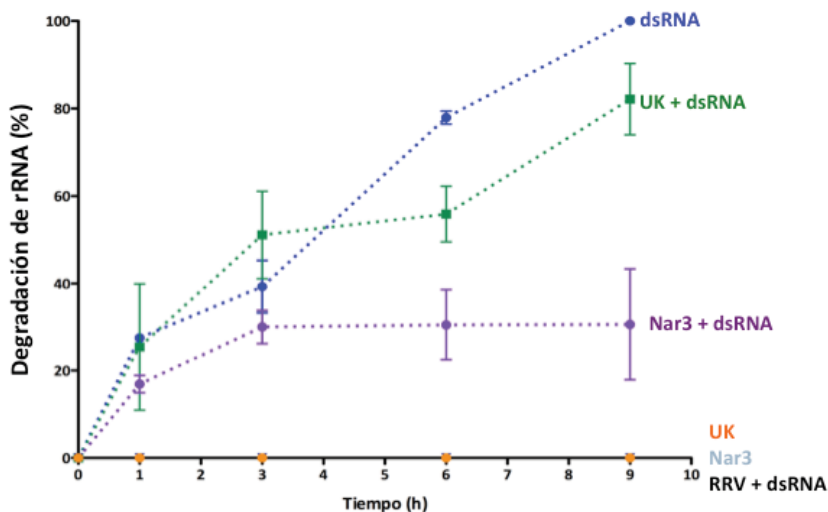


Figura 6.15: Efecto de la infección con diferentes cepas de rotavirus solas o en combinación con el dsRNA sobre la degradación de los rRNAs. Células MA104 fueron infectadas con las cepas de rotavirus señaladas y lipofectadas o no con el dsRNA. A los tiempos indicados, las células fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas. Se muestran las medias aritméticas \pm desviación estándar de al menos dos experimentos independientes.

En estos ensayos encontramos que durante la infección con UK o Nar3 no se detectó la degradación de los rRNAs. Sin embargo, encontramos que la cepa UK no fue capaz de prevenir ni en tiempos tempranos ni en tiempos tardíos la degradación inducida por el

dsRNA, lo que sugiere que esta cepa, a diferencia de RRV, no cuenta con los mecanismos para controlar la vía OAS/RNasa L, o éstos son menos eficientes.

La cepa Nar3 es una variante de RRV que tiene un fenotipo de resistencia al tratamiento con NA. Por secuenciación se encontró que este fenotipo es debido al cambio de un sólo aminoácido (K187R) localizado en la subunidad VP8 de la proteína VP4 ([15](#)). Este hallazgo se confirmó al aislar una revertante de Nar3 (rNar3-14), cuyo fenotipo vuelve a ser NA-sensible y el aminoácido que cambia es la R en posición 187 por K de nuevo. También se ha demostrado que Nar3 no requiere la interacción de VP8 con SA terminales, usando a la integrina $\alpha_2\beta_1$ como receptor inicial, la cual es reconocida por el tripéptido DGE presente en el dominio VP5 de la proteína VP4 ([14](#), [84](#)). Los datos obtenidos con las SIPs presentados anteriormente, sugieren que la proteína VP4 del rotavirus de la cepa RRV podría estar involucrada en el control de la RNasa L, dado que se ha corroborado que un solo cambio de un aminoácido, en este caso el cambio K187R en VP4 de la cepa RRV, es capaz de influenciar la ruta de internalización celular de Nar3 ([14](#)). Se decidió evaluar las repercusiones de este cambio en la capacidad de los RVs de controlar a la RNasa L. Para tal propósito se infectaron células con las variantes Nar3 y su revertante, la r-Nar3-14 en ausencia o presencia del dsRNA y se determinó la capacidad de dichas variantes para prevenir la degradación de los rRNAs. Interesantemente encontramos que en tiempos tempranos de la infección, la cepa Nar3 no fue capaz de controlar la degradación de los rRNAs inducida por dsRNA, pero en tiempos tardíos de la infección, si la controló. Estos resultados sugieren que Nar3 no es capaz de inducir la primera señal de modulación del complejo OAS/RNasa L, pero cuenta con el segundo mecanismo que le permite controlar esta vía antiviral. Para profundizar en la caracterización de este fenotipo, decidimos estudiar si la revertante r-Nar3 era capaz de modular el complejo OAS/RNasa L. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.16.

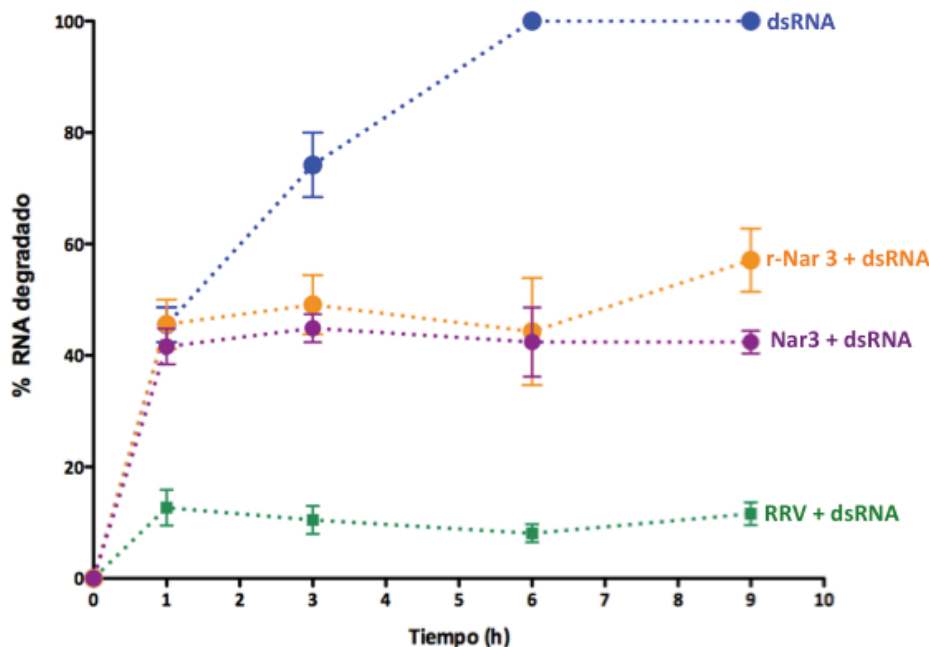


Figura 6.16: Efecto de la infección con la r-Nar3 soia o en combinación con un inductor del complejo OAS/RNasa L sobre la degradación de los rRNAs. Células MA104 fueron infectadas con las cepas de rotavirus señaladas y lipofectadas o no con el dsRNA. A los tiempos indicados, las células fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas. Se muestran las medias aritméticas \pm desviación estándar de al menos dos experimentos independientes.

Contrario al resultado que esperábamos, durante la infección con esta revertante no encontramos degradación de los rRNAs; al menos hasta las 9 hpi, por lo que estos ensayos no proporcionaron información adicional acerca de las posibles moléculas involucradas en la modulación de la vía OAS/RNasa L por RRV durante tiempos tempranos de la infección. En estos ensayos también encontramos que la cepa UK no fue capaz de modular la vía OAS/RNasa L (Figura 6.15). Para determinar si la VP4 de RRV era la responsable directa de esta modulación decidimos caracterizar el comportamiento de una colección de virus rearreglantes entre las cepas RRV y UK (obtenida por Y. Hoshino NIH). Utilizamos la rearreglante 19-1-1, cuyos segmentos 4 y 8 son de UK, y que codifican para las proteínas VP4 y NSP2, respectivamente y el resto de los segmentos del genoma provienen de RRV. Los resultados obtenidos con esta rearreglante se muestran en la Figura 6.17.

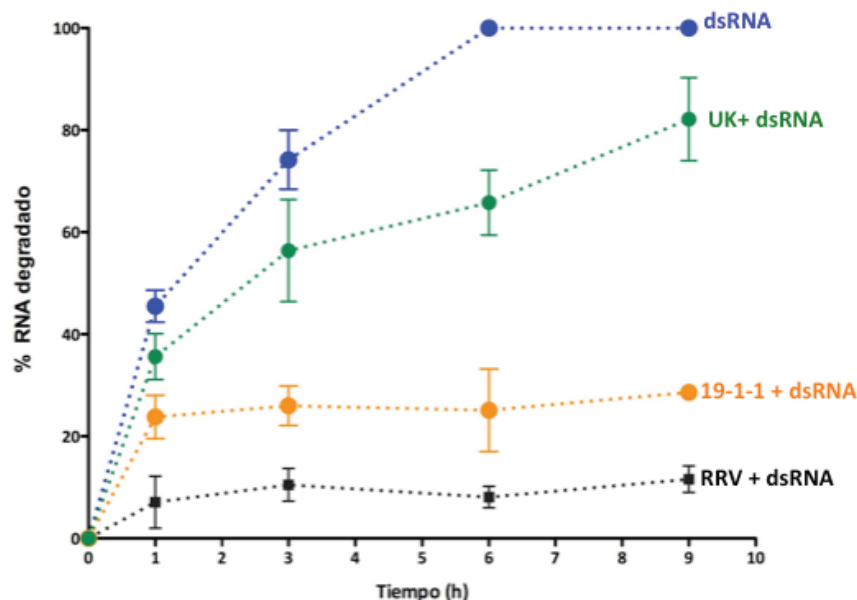


Figura 6.17: Efecto de la infección con la rearreglante 19-1-1 sola o en combinación con el dsRNA sobre la degradación de los rRNAs. Células MA104 fueron infectadas con los virus indicados y lipofectadas o no con el dsRNA. A los tiempos indicados, las células fueron cosechadas y el RNA total fue purificado y analizado en el Bionalizador. Los productos de corte de la RNasa L fueron cuantificados en cada una de las condiciones descritas. Se muestran las medias aritméticas \pm desviación estándar de al menos dos experimentos independientes.

Como se observa en la figura anterior, el fenotipo de esta rearreglante parece un intermedio entre el fenotipo de UK y RRV con respecto a la modulación de la vía antiviral OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección. Si bien durante la infección con este rearreglante no encontramos degradación de los rRNAs hasta las 9 hpi, dicha rearreglante no previno de manera similar a RRV la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA, ya que la degradación en esta condición fue mayor, pero también fue menor que la observada en la condición UK + dsRNA. Estos resultados podrían sugerir que la VP4 no es la única proteína viral implicada en la modulación de la vía OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección. Será necesario explorar la participación de VP7, que también se sabe es importante en el proceso de entrada de los RVs.

IDENTIFICACIÓN DEL O LOS COMPONENTES DE LOS ROTAVIRUS INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIVIRAL RNasa L EN LA LÍNEA CELULAR MA104 EN TIEMPOS TARDÍOS DE LA INFECCIÓN POR RRV.

6.10 La proteína VP3 está involucrada en la modulación del complejo OAS/RNasa L

Los resultados mostrados en las Figuras 6.6 y 6.7 sugieren que se requiere la síntesis *de novo* de algún componente viral para que RRV controle de manera eficiente la vía OAS/RNasa L, por lo que decidimos silenciar de manera individual cada una de las proteínas virales.

Las Figuras 6.18 y 6.19 muestran que se logró silenciar de manera eficiente las proteínas de RRV y posteriormente se evaluó el efecto de su ausencia sobre la activación de la vía OAS/RNasa L, en presencia o no del dsRNA. Encontramos que, en ausencia de cualquiera de las proteínas virales, no hubo degradación de los rRNAs durante la infección con RRV. Sin embargo, al adicionar el activador del complejo, el dsRNA, encontramos que en ausencia de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP4, VP6 y VP7 o en las células tratadas con un siRNA irrelevante, el tratamiento con dsRNA fue incapaz de inducir la degradación de los rRNAs. Interesantemente, en ausencia de la VP3, la infección con RRV fue incapaz de impedir la degradación de los rRNAs, lo que evidencia el papel de esta proteína en el control del complejo OAS/RNasa L (Figura 6.18).

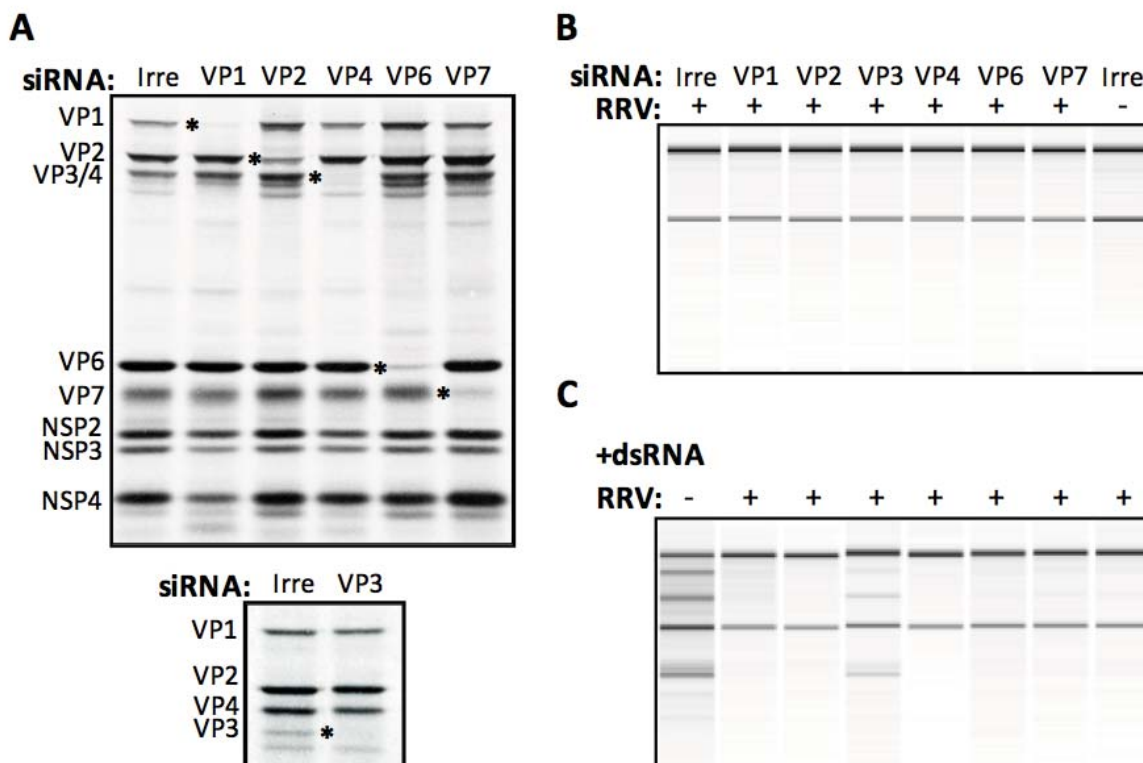


Figura 6.18: Efecto de la ausencia de las proteínas virales estructurales en la modulación de la vía OAS/RNasa L. Las células transfectadas con los siRNAs indicados, fueron infectadas o no con RRV a una MOI de 10. 8.5 hpi las células fueron marcadas durante 30 min con ^{35}S y posteriormente lisadas. Las proteínas marcadas se resolvieron por SDS-PAGE al 10% o al 6% y se detectaron por autorradiografía (A). En (B) y (C) se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes, en donde se analizó la integridad de los rRNAs de células tratadas con los siRNAs indicados e infectadas con RRV (B) y lipofectadas con 500 ng de dsRNA durante 9h (C).

Para las proteínas no estructurales, encontramos que en ausencia de cualquiera de éstas no hubo degradación de los rRNAs durante la infección con rotavirus (datos no mostrados). Al adicionar dsRNA, encontramos que en las células tratadas con el siRNA irrelevante, NSP1, NSP2, NSP4, NSP5 e infectadas con RRV, el dsRNA fue incapaz de inducir la degradación de los rRNAs. Pero, en aquellas células, en las que se abatió la expresión de NSP3, RRV fue incapaz de impedir la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA, tal como se observa en la figura 6.19.

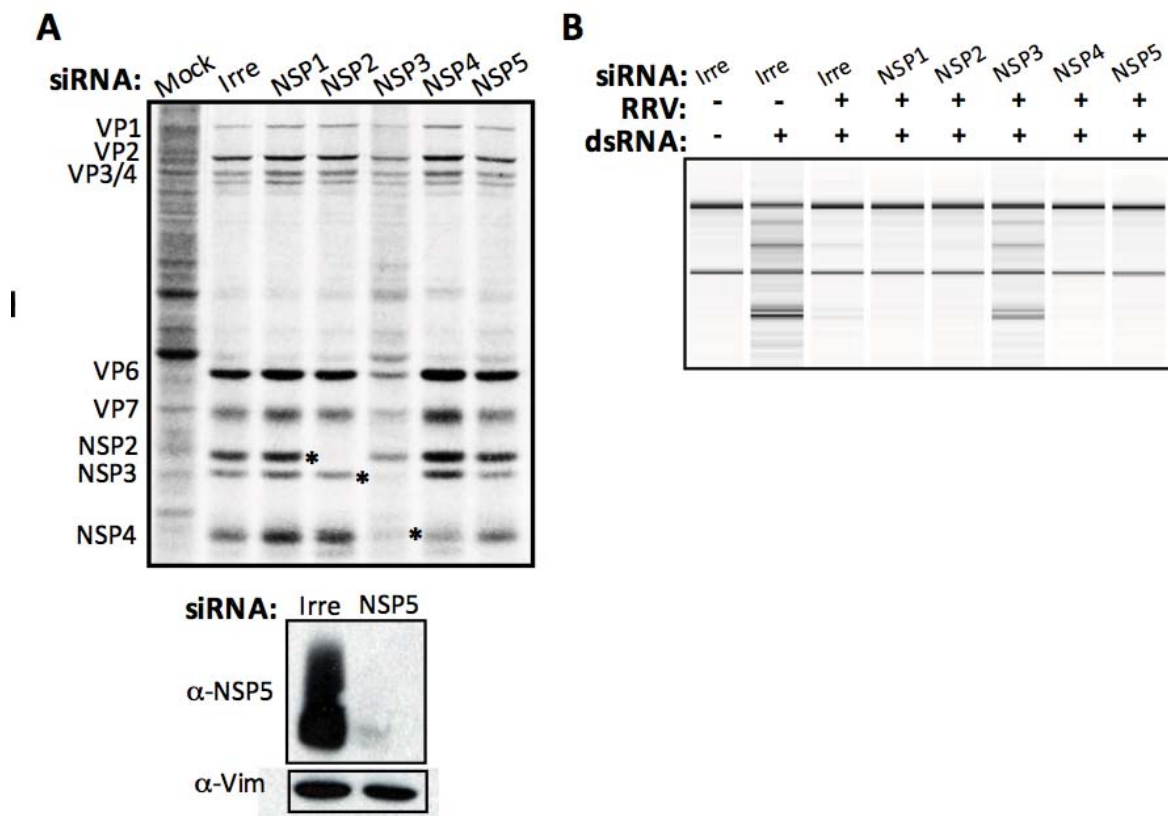


Figura 6.19: Efecto de la ausencia de las proteínas virales no estructurales en la modulación de la vía OAS/RNasa L. Las células transfectadas con los siRNAs indicados fueron infectadas o no con RRV a una MOI de 10. 8.5 hpi las células fueron marcadas durante 30 min con ^{35}S y posteriormente lisadas. Las proteínas marcadas se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se detectaron por autorradiografía o por inmuoblot; para determinar la abundancia de la proteína NSP5 en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irre) o con el siRNA dirigido a la NSP5. La detección de vimentina (Vim) fue usada como control de carga. Los anticuerpos (α -) empleados son indicados (A). Imagen representativa de tres experimentos independientes, en donde se analiza la integridad de los rRNAs de células tratadas con los siRNAs indicados e infectadas con RRV y lipofectadas con 500 ng de dsRNA durante 9h (B).

Estos resultados sugieren que NSP3 podría también estar involucrada en la modulación del complejo OAS/RNasa L. No obstante, verificamos que esta falta de control es un efecto indirecto ya que como se observa en la misma figura, la autorradiografía de las proteínas virales muestra que al silenciar a NSP3, el resto de las proteínas virales disminuyó drásticamente, incluida la VP3. Experimentos no mostrados en este trabajo nos permitieron concluir que el tratamiento con el siRNA NSP3 disminuye la cantidad de VP3 y esta disminución es la responsable de la falta de control de la vía OAS/RNasa L por RRV. Estos resultados son diferentes a los que se han reportado en nuestro grupo, en los que al silenciar NSP3 la síntesis del resto de las proteínas virales no se ve afectada. En experimentos no

mostrados encontramos que esta diferencia se debe a la MOI utilizada en estos ensayos, que fue de 10, a diferencia de la que se ha empleado en los trabajos publicados que es de 3.

Los resultados obtenidos al silenciar las proteínas virales sugieren que la proteína VP3 es requerida para un control eficiente de la vía OAS/RNasa L. Para caracterizar con mayor detalle la capacidad de VP3 de modular esta vía antiviral, evaluamos la capacidad de RRV de controlar la degradación de los rRNAs inducida por dsRNA y por los 2'5-A, en ausencia de VP3. Hasta ahora, la única función conocida de los 2'5-A, es la de activar a la RNasa L (85). Para hacer más específica la activación de la RNasa L y para elucidar el nivel al que VP3 participa en la modulación del complejo antiviral, utilizamos los 2'5-A en estos ensayos. Silenciamos la expresión de VP3 y a manera de control, a la proteína VP1, que es la polimerasa viral. En nuestro laboratorio se demostró previamente que el silenciamiento de VP3 o VP1 conlleva a una disminución en la cantidad de mensajero y genoma viral, pero sin afectarse la síntesis de proteínas virales (79). Dado a que los efectos al silenciar VP1 o VP3 son similares, se seleccionó al interferente dirigido contra VP1 para evaluar si lo observado en ausencia de VP3 es específico para esta proteína.

Encontramos que durante la infección con RRV en células tratadas con el interferente para VP1 y posteriormente expuestas al dsRNA o a los 2'5-A, RRV no pierde su capacidad de prevenir la degradación de los rRNAs. En cambio, en células tratadas con el interferente para VP3, infectadas y expuestas al dsRNA o a los 2'5-A, los rRNAs se degradaron, lo que evidencia la capacidad de la VP3 de RRV para controlar la degradación de los rRNAs inducida el dsRNA y /o los 2'5-A (Figura 6.20).

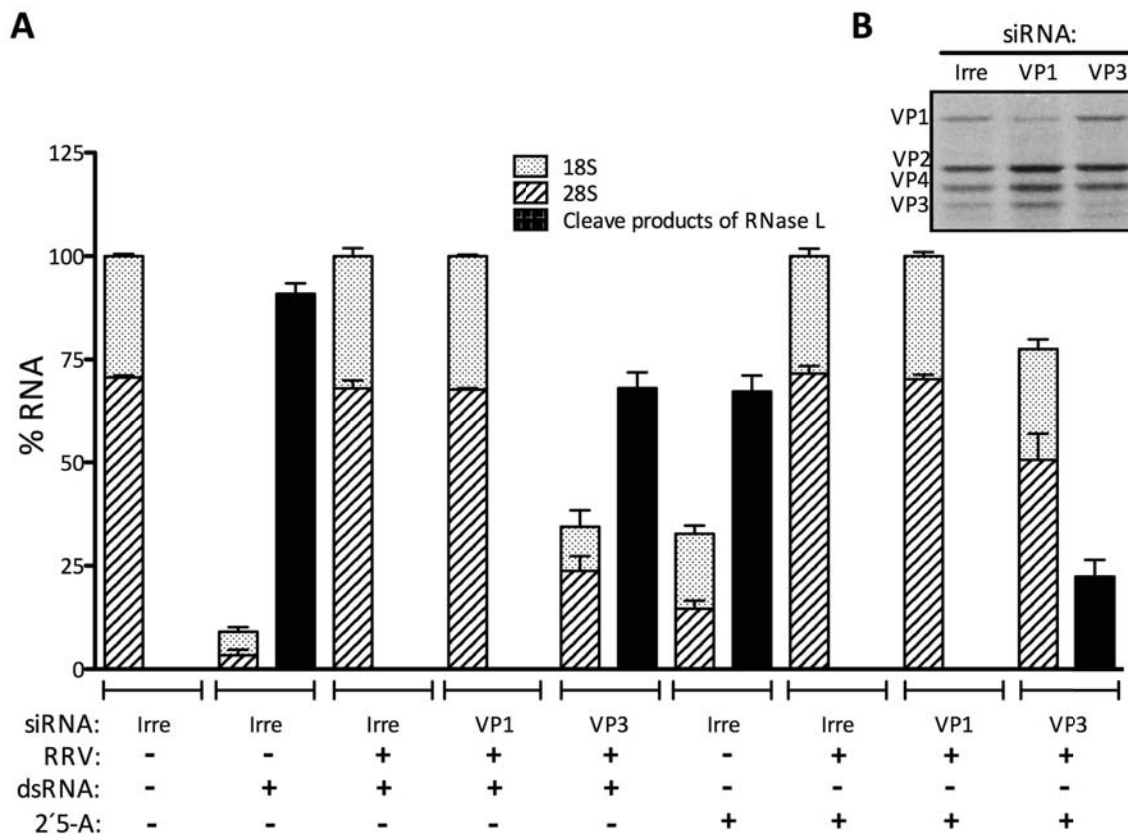


Figura 6.20: Efecto del silenciamiento de VP3 en la modulación de la vía OAS/RNasa L. Las células transfectadas con los siRNAs indicados fueron infectadas o no con RRV a una MOI de 10. 8.5 hpi las células fueron marcadas durante 30 min con ^{35}S y posteriormente lisadas. Las proteínas marcadas se resolvieron por SDS-PAGE al 6% y se detectaron por autorradiografía (inserto). En paralelo, células transfectadas con los siRNAs indicados fueron o no infectadas con RRV a una MOI de 10 y al mismo tiempo lipofectadas o no con dsRNA o con los 2'5-A. A las 9hpi, las células fueron lisadas y el RNA total purificado y analizado. Los productos de corte de la RNasa L y el rRNA fueron cuantificados en cada condición. Se muestran las medias aritméticas \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos con los silenciamientos de VP3 muestran que esta proteína participa en la modulación de la RNasa L durante la infección con RRV. En un estudio bioinformático para identificar nuevos miembros de la familia de las 2-fosfodiesterasas (PDs), Mazumder *et al* (65) reportaron que las proteínas VP3 de ciertos rotavirus y la proteína no estructural 2 (ns2) del coronavirus murino contienen un dominio con posible actividad de 2-PDs. Las 2-PDs son reguladores negativos de la vía OAS/RNasa L. Recientemente, Weiss y colaboradores (40), mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, demostraron que el dominio C-terminal (CTD) de la VP3 tiene actividad de 2-PDE, capaz de reducir los niveles de los 2'5-A

producidos por las OAS en respuesta a un estímulo con un agonista de dsRNA, previniendo de esta manera la activación de la RNasa L. Bajo el contexto de la infección con el coronavirus de la hepatitis murina (MHV), encontraron que quimeras del MHV que expresan una forma inactiva de ns2 y el CTD de VP3 recuperaron la habilidad de replicarse de manera eficiente en macrófagos o en el hígado de ratones infectados, mientras que las quimeras que expresan una forma inactiva del CTD de VP3, que tiene mutado un aminoácido esencial para su actividad como PDE, la replicación de este virus quimérico fue deficiente. Con base en estos experimentos, este grupo demostró que el CTD de VP3 es una 2'5-PDE capaz de sustituir funcionalmente a la ns2 en el contexto de la infección con MHV. Estos resultados concuerdan con los resultados que hemos obtenido hasta la fecha y explican el mecanismo de acción por el cual la VP3 de RRV es capaz de modular la actividad de la RNasa L en células MA104.

6.11 Relevancia del papel antagónico de la VP3 sobre la vía OAS/RNasa L en el ciclo infeccioso de RRV

Una vez que encontramos que la VP3 de RRV es capaz de controlar la actividad de la RNasa L, decidimos evaluar la relevancia de esta actividad de VP3 en la infección por rotavirus. En nuestro grupo de trabajo, hemos observado que cuando VP3 es silenciada hay una drástica disminución en la cantidad de mensajeros virales y RNA genómico producido durante la infección, así como una disminución en el rendimiento viral (la producción de partículas virales infecciosas prácticamente es abatida en ausencia de VP3), sin que se afecte la síntesis de proteína viral (79). Este fenotipo se asoció a la ausencia de la actividad de guanilil-metil-transferasa de la VP3. El hecho de que en ausencia de VP3 el rendimiento viral disminuya podría estar también asociado a la falta de control de RNasa L durante la infección. Para probar esta hipótesis, decidimos silenciar simultáneamente la RNasa L y la VP3 y evaluar el rendimiento viral, cuantificando la producción de partículas infecciosas en ausencia de estas dos proteínas. Cuando la VP1 o la VP3 son silenciadas, la producción de partículas virales infecciosas disminuyó (Figura 6.21), tal como se había reportado previamente (79), mientras que en ausencia de la RNasa L, la producción de partículas virales infecciosas se incrementó en más del doble, como ya lo habíamos observado (Figura 6.0). Sorprendentemente,

encontramos que en células donde se co-silencia VP3 y RNasa L, aumentó la producción de partículas virales infecciosas e incluso, en estas condiciones, la cantidad de virus infeccioso producido es mayor que en la condición control. Probamos también el co-silenciamiento de RNasa L con VP1 (que no participa en la modulación de la RNasa L), para evaluar el efecto de su ausencia junto con la RNasa L. Pero no se observó que la progenie viral se recupere en ausencia de VP1 y RNasa L. El hecho de que sólo se recupera la progenie viral infecciosa en células en las que se co-silencia VP3 con la RNasa L y no en al co-silenciar VP1/RNasa L, sugiere que la actividad de 2-fosfodiesterasa de VP3 es fundamental para la producción de virus infecciosos.

Dado que la actividad de VP3 como 2-PDE era desconocida hasta hace poco, se había asumido que el fenotipo asociado a la ausencia de VP3 era debido a la falta de la estructura Cap en los transcritos virales, hipótesis que podemos descartar con nuestros resultados, puesto que al silenciar RNasa L/VP3, la actividad de guanilil-metil-transferasa es nula o al menos está muy disminuida y sin embargo, el ensamble de nuevas partículas infecciosas es incluso más eficiente que en la condición control (Fig. 6.21 B).

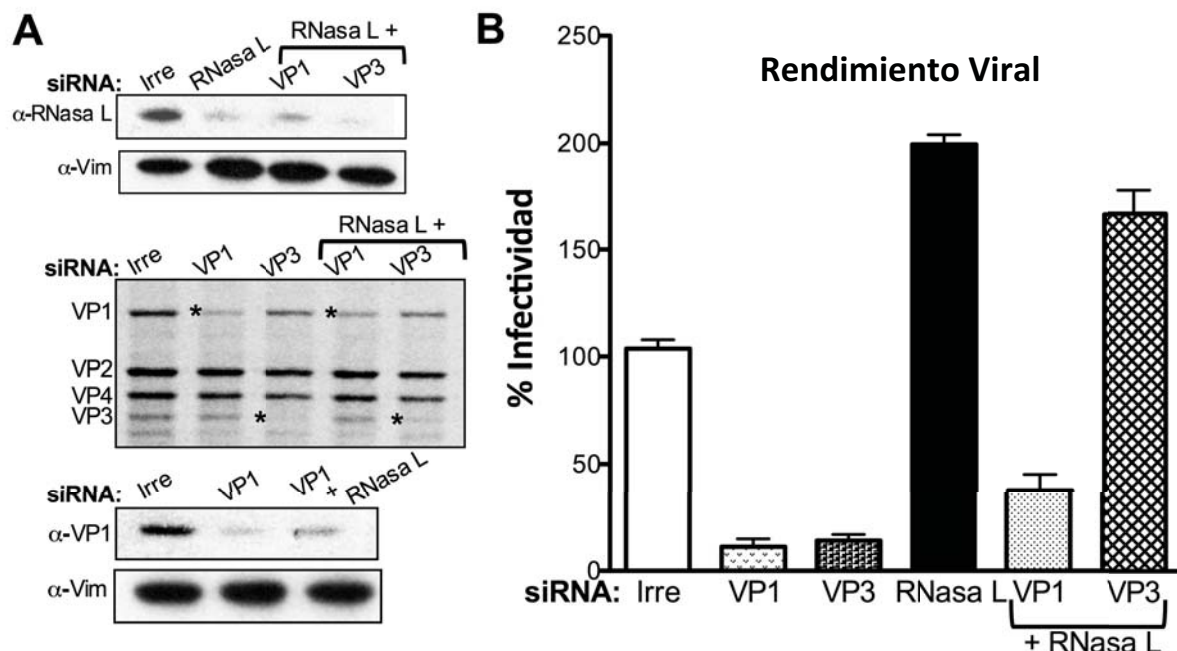


Figura 6.21: Rendimiento viral de RRV en presencia de los siRNAs dirigidos contra las proteínas virales VP1 y VP3, solos o en combinación con los siRNAs dirigidos a la RNasa L. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados. A las 72 hpt, las células fueron o no infectadas con RRV a una MOI de 10. A las 8.5 hpi, las células fueron marcadas durante 30 minutos con 25 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ con S^{35} y posteriormente lisadas. Las proteínas marcadas fueron resueltas por SDS-PAGE al 6% o 10% y detectadas por autorradiografía o por WB. Los

anticuerpos usados son indicados, la detección de vimentina (Vim) fue usada como control de carga, los asteriscos indican la posición de la proteína silenciada (A). En paralelo, las células transfectadas con los siRNAs indicados fueron infectadas con una MOI de 3. 12 hpi las células fueron lisadas y los títulos virales fueron determinados por un ensayo de inmunoperoxidasa. Los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado (B).

Para corroborar estos resultados, evaluamos directamente la integridad de los transcritos virales (que son sustrato de la RNasa L activa), mediante ensayos tipo Northern blot. Como se observa en la Figura 6.22, el mensajero de NSP4 se detecta en células infectadas con RRV. Al silenciar VP1 o VP3, la cantidad de este mensajero viral fue casi indetectable. En contraste, al silenciar la expresión de la RNasa L, la cantidad de este mensajero viral se incrementó en más del doble. Al co-silenciar VP3 y RNasa L, la cantidad de mensajero viral aumentó casi 5 veces con respecto a la condición en la que solo se silenció VP3, superando inclusive la cantidad de mensajero viral producido en la condición control (Irre).

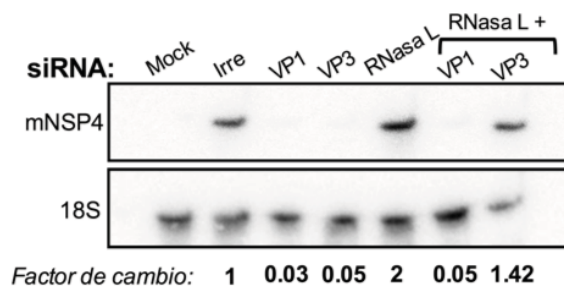


Figura 6.22: Efecto del silenciamiento de la expresión de las proteínas VP1 y VP3 solas o en combinación con RNasa L en la estabilidad de los transcritos virales. Northern blot representativo para determinar la abundancia del mensajero para el gene 10 de RRV (mNSP4) en células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados, infectadas o no con RRV a una MOI de 10 durante 9 h. La detección del RNA de la subunidad ribosomal 18S fue usada como control de carga. El factor de cambio relaciona la expresión del mNSP4 normalizada con respecto a 18S.

Los resultados obtenidos en estos ensayos son congruentes con los resultados obtenidos al cuantificar la progenie viral; en las condiciones en donde la progenie fue mayor, la cantidad de mensajero viral también fue mayor y viceversa.

En conjunto todos estos resultados demuestran la importancia del control de la RNasa L por VP3. En ausencia de VP3, la RNasa L se encuentra activa y es capaz de degradar los mensajeros virales. Muy probablemente la falta de control de la RNasa L es responsable del

fenotipo observado al silenciar la expresión de VP3, cuando se observa una disminución del mRNA y del dsRNA viral, y una disminución en la producción de progenie viral infecciosa.

Los resultados hasta aquí presentados fueron publicados en *Journal of Virology* (JVI): “Rotavirus Controls Activation of the 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase/RNase L Pathway Using at Least Two Distinct Mechanisms”. Sánchez-Tacuba L, Rojas M, Arias CF, López S. *J Virol.* 2015 Dec;89(23):12145-53. doi: 10.1128/JVI.01874-15. Dicho artículo se incluye en la sección de anexos.

6.12 Caracterización de las partículas ensambladas en presencia de los siRNAs VP3/RNasa L

Los resultados mostrados indican que la proteína VP3 de la cepa RRV está involucrada en el control del complejo OAS/RNasa L y que su actividad como guanilil metil transferasa (64) parece no ser esencial para el ciclo replicativo del virus. En ausencia de esta proteína se observa una drástica disminución en la progenie viral (79) y sabemos que este fenotipo está relacionado a la falta de actividad de VP3 como PDE. Nuestros resultados también sugieren: 1) que las partículas infecciosas de rotavirus pueden ensamblarse sin la VP3 y 2) cuando la adición del Cap a los mensajeros virales no ocurre, o al menos está drásticamente disminuida, la replicación de RRV no se ve afectada. Esta hipótesis contradice el paradigma actual, en el que se asume que la traducción de los mensajeros de rotavirus es dependiente del Cap. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que aún sin el Cap, los mensajeros virales se pueden traducir y hay producción eficiente de partículas virales infecciosas. Uzri y colaboradores encontraron de manera indirecta que en la infección con rotavirus, sólo una minoría de la población de mensajeros virales contiene Cap en el extremo 5', y propusieron que la actividad de guanilil-metil-transferasa de VP3 es poco eficiente (86). Con la finalidad de someter a prueba las hipótesis surgidas a partir de nuestros resultados, nos propusimos estudiar a mayor detalle las partículas virales ensambladas en presencia de los siRNAs VP3/RNasa L y con ello determinar si en estas condiciones, las partículas ensambladas contienen o no a la proteína VP3 y si los RNAs encapsidados en las partículas virales contienen o no Cap.

-Obtención de partículas virales

Para la obtención de partículas virales, células MA104 fueron lipofectadas con el o los siRNAs correspondientes. 72 horas después de la transfección, se infectaron con RRV durante 12 horas a una MOI de 10. A las 4 hpi el medio fue reemplazado por MEM sin metionina suplementado con 25 $\mu\text{Ci/mL}$ de Easy Tag Express S^{35} , con el cual permanecieron hasta el término de la infección. Enseguida, las partículas virales fueron purificadas mediante una centrifugación isopícnica con CsCl, pero la cantidad de partículas virales recuperadas fue tan baja que fue imposible su análisis. Se utilizaron colchones de sacarosa para concentrar dichas partículas virales, las cuales posteriormente fueron analizadas mediante ensayos tipo Western blot, empleando como anticuerpos primarios un suero producido en conejo anti-VP3 y el $\alpha\text{-TLPs}$. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.23.

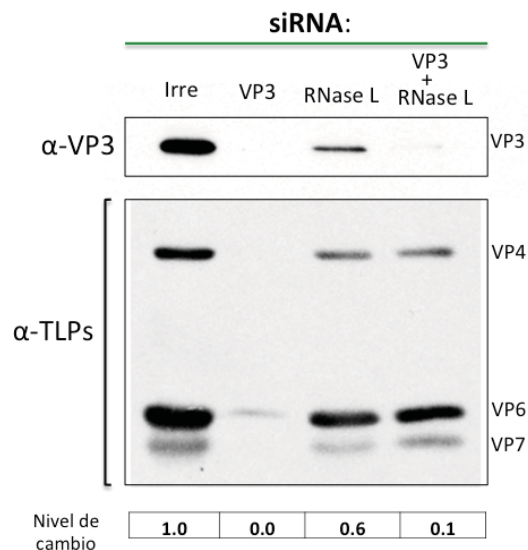


Figura 6.23: Perfil proteico obtenido por ensayos tipo WB de las partículas virales ensambladas en presencia de los siRNAs: Irrelevante (Irre), VP3, RNasa L y VP3/RNasa L. Empleando los anticuerpos policlonales anti-VP3 (parte superior) y el anticuerpo policlonal $\alpha\text{-TLPs}$ (parte inferior). El nivel de cambio para cada tratamiento se obtuvo con el siguiente algoritmo:

Como se observa en la Figura 6.23, al silenciar la expresión de VP3 la producción de partículas virales disminuyó drásticamente. Apenas es notable la presencia de la proteína VP6 por WB. En cambio, al silenciar RNasa L o al co-silenciar VP3 y RNasa L, observamos la presencia de las proteínas estructurales VP4, VP6 y VP7, aunque la cantidad de proteína viral fue menor en ambos tratamientos comparado con la condición control (Irre).

Interesantemente en la condición de co-silenciamiento, pese a que prácticamente la VP3 fue indetectable, el resto de las proteínas estructurales fue detectable con el anti-TLPs y fue prácticamente equivalente a lo observado al silenciar RNasa L. Esta observación sugiere que las partículas virales se pueden ensamblar en ausencia de VP3, suceso completamente desconocido hasta la fecha. Para determinar si estas partículas además eran infecciosas, evaluamos la infectividad de las muestras obtenidas en cada tratamiento. En la Figura 6.24 se muestra el resultado de dos experimentos independientes.

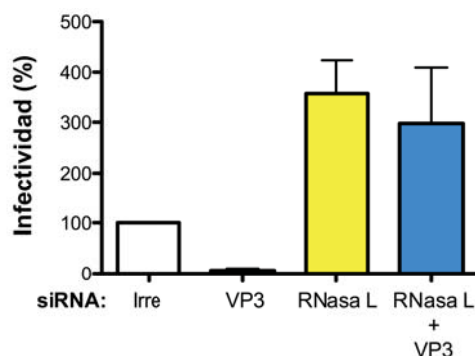


Figura 6.24: Infectividad de las partículas virales ensambladas en presencia de los siRNAs: Irrelevante (Irre), VP3, RNasa L y VP3/RNasa L. Los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Cuando la VP3 fue silenciada, la progenie viral infecciosa disminuyó en más de un 90%, mientras que al silenciar la RNasa L, observamos que la progenie viral fue mayor que en la condición control. Sorprendentemente, al co-silenciar VP3 y la RNasa L, encontramos que las partículas carentes de la VP3 (al menos indetectable por Western blot) son igual de infecciosas que las partículas virales completas. Si bien los resultados presentados hasta el momento sólo corresponden a dos experimentos, sugieren que es posible el ensamble de partículas virales infecciosas carentes de la proteína VP3. Serán necesarios más experimentos, en donde sea posible la fácil cuantificación de las proteínas virales en las partículas obtenidas, con el fin de sustentar esta hipótesis. Una vez obtenidas las partículas virales, será interesante evaluar la presencia del Cap contenido en el RNA encapsidado en estas condiciones así como la actividad de guanilil-transferasa de estas partículas en ensayos de transcripción *in vitro*.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE MODULAN LA VÍA OAS/RNasa L DURANTE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS DE LA CEPA BOVINA UK

6.13 La disminución de la proteína RNasa L tienen efecto en la producción de partículas virales infecciosas

Dado el potencial antiviral del complejo OAS/RNasa L para restringir la infección de RRV, decidimos evaluar el efecto de la ausencia de la proteína RNasa L en la producción de progenie viral (rendimiento viral) estudiando otra cepa de rotavirus, el rotavirus bovino UK. Como se menciona en la introducción y en parte de los resultados ésta cepa bovina se comporta de manera diferente a la cepa de RRV en cuanto a sus requerimientos de entrada y además, es mas sensible al pretratamiento de las células con interferón. Para estos ensayos, las células fueron lipofectadas con el siRNA correspondiente e infectadas con el rotavirus de la cepa bovina UK para la determinación del rendimiento viral. Los resultados se muestran en la Figura 6.25. La eficiencia del silenciamiento de la RNasa L fue verificada mediante Western blot y es mostrada en la misma figura.

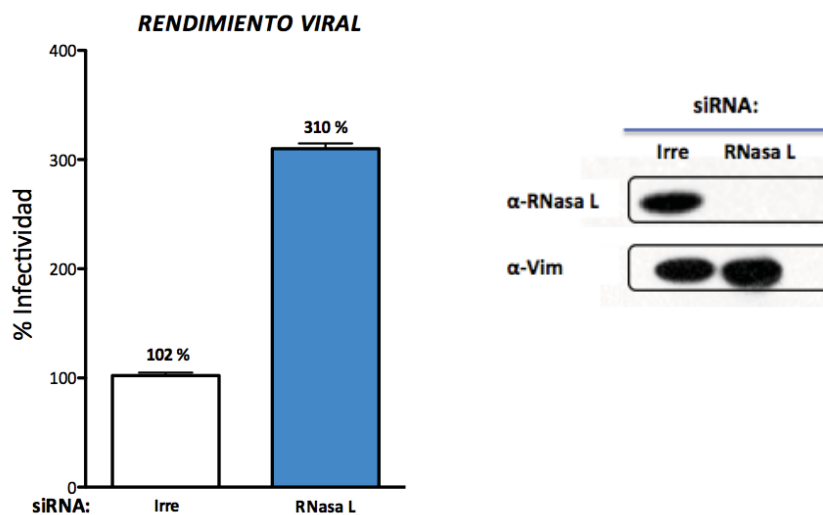


Figura 6.25: Efecto de la ausencia de la proteína RNasa L en la producción de partículas virales infecciosas. Los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de al menos tres experimentos independientes por duplicado. El silenciamiento de la RNasa L se verificó por ensayos tipo Western blot y se aprecia que se logró disminuir la proteínas de interés a niveles tan bajos, que fue prácticamente indetectable por el anticuerpo correspondiente. El anticuerpo α -vimentina se usó como control de carga.

Encontramos que en ausencia o al menos en niveles reducidos de la RNasa L, la cantidad de virus UK infeccioso producido se triplicó; comparado con el virus producido en la condición control. Este resultado sugiere que el complejo OAS/RNasa L también tiene un papel importante en la defensa celular contra la infección del rotavirus bovino UK. De los resultados obtenidos con la cepa RRV, sabemos que la proteína VP3 tiene un papel fundamental en el control de la RNasa L, por lo que decidimos evaluar el efecto de su ausencia en la capacidad infecciosa del virus mediante ensayos de infectividad así como la cantidad de virus infeccioso producido (rendimiento viral); empleando para ello el siRNA dirigido contra la VP3 de RRV. Los resultados se muestran en la Figura 6.26.

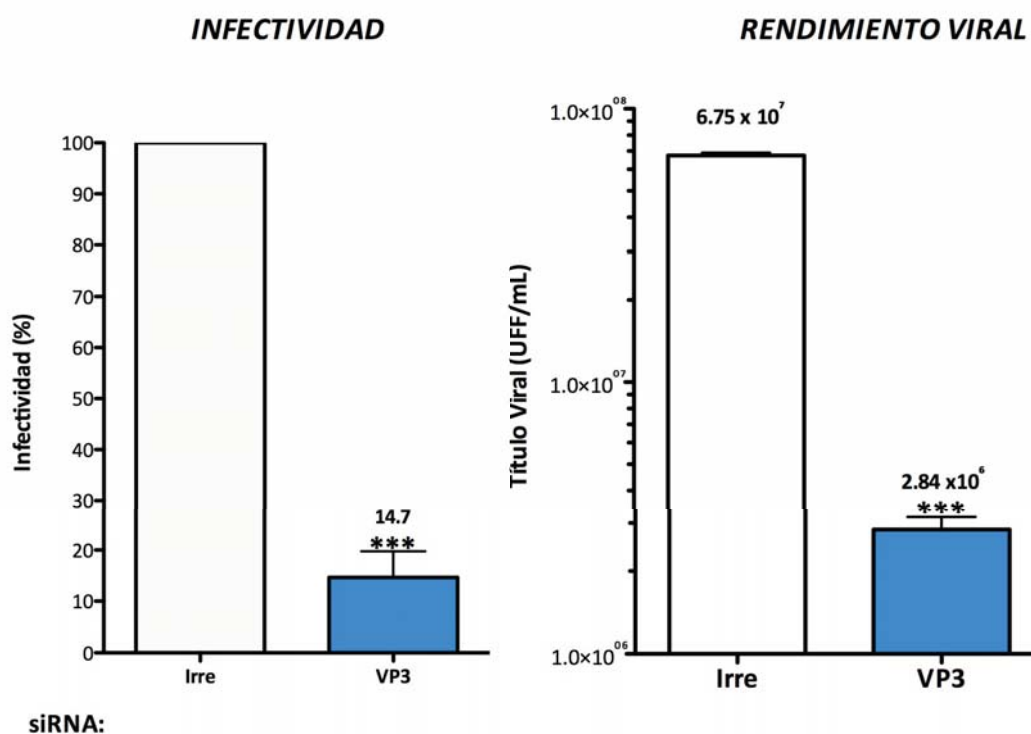


Figura 6.26: Efecto de la ausencia de VP3 sobre la infectividad y producción de partículas virales infecciosas. Para la infectividad, los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de cuatro experimentos independientes por duplicado. Para la progenie viral, los resultados se muestran como título viral en unidades formadoras de foco (UFFs)/mL. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre la infectividad de células tratadas con un siRNA irrelevante y las tratadas con el resto de los siRNAs indicados en la figura (***) $P \leq 0.001$.

En el contexto de la infección con UK, el tratamiento con el interferente de VP3 afectó drásticamente tanto la infectividad como el rendimiento viral; comparado con el virus producido en la condición control. Este efecto fue incluso mayor al observado en la infección con RRV. Los resultados obtenidos evidencian el importante papel de la proteína VP3 en el ciclo infeccioso de UK. Para determinar la importancia relativa de las actividades de VP3 como 2-PDE y de guanilil-metil-transferasa en la infección con UK, decidimos emplear la estrategia de los dobles silenciamientos, tal como se hizo con RRV. La Figura 6.27 muestra los resultados obtenidos.

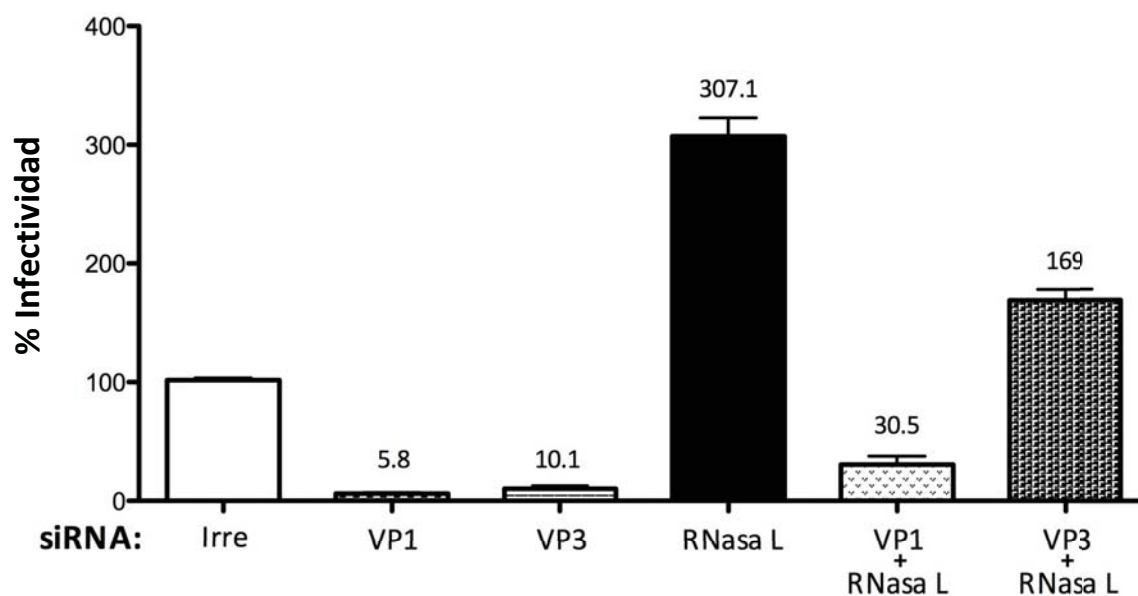


Figura 6.27: Rendimiento viral de UK en presencia de los siRNAs dirigidos contra las proteínas virales VP1 y VP3, solos o en combinación con los siRNAs dirigidos a la RNasa L. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados. A las 72 hpt, las células fueron o no infectadas con UK a una MOI de 3. A las 12 hpi, las células fueron lisadas y los títulos virales fueron determinados por un ensayo de inmunoperoxidasa. Los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Similar a lo observado para RRV, encontramos para UK que en ausencia de VP3 la progenie viral disminuye, pero esta se incrementa en alrededor de tres veces cuando la RNasa L está disminuida. En ausencia de VP3 y RNasa L, encontramos que la progenie viral producida es incluso mayor que la obtenida en nuestra condición control, lo que confirma la relevancia de

la actividad de VP3 como PDE para el control de la actividad de RNasa L en el ciclo replicativo de UK.

En conjunto, todos estos ensayos demuestran la importancia del control de la RNasa L por VP3. En ausencia de VP3, la RNasa L se encuentra activa y es capaz de degradar los RNAs virales de cadena sencilla. La falta de control de la RNasa L muy probablemente es la responsable del fenotipo observado al silenciar VP3 relacionado a la disminución de la infectividad y progenie viral.

Si bien encontramos que la vía OAS/RNasa L tiene la capacidad de limitar la infección de los rotavirus de las cepas RRV y UK, los resultados mostrados previamente indican que hay diferencias entre ambas cepas en su capacidad de controlar la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA. En el caso de RRV, la degradación de los rRNAs es prácticamente indetectable en ausencia o presencia del RNA de doble cadena. En la infección con UK, no se detecta la degradación de los rRNAs, pero al transfectar dsRNA en células infectadas se observó una severa degradación de los rRNAs, a diferencia del comportamiento de RRV, lo que sugiere que los mecanismos utilizados por UK para modular la vía OAS/RNasa L podrían ser menos eficientes que los de RRV, por lo que decidimos explorar la naturaleza de esta falta de control observada en la cepa UK.

Como mencionamos previamente, los rotavirus UK y RRV tienen ciertas diferencias. Una de estas es el tiempo de entrada a la célula. Mientras que el 75% de las partículas de RRV entran a la célula en 60 min, en UK apenas entre un 15-20% de las partículas entran a la célula en ese mismo periodo de tiempo (13). Dada esta diferencia en los tiempos de entrada, podríamos proponer como hipótesis que la falta de control de UK podría deberse a este retraso en la entrada, que también resulta en un retraso en el inicio de la síntesis de proteínas virales, entre ellas VP3. Para probar esta hipótesis, infectamos células con RRV o UK y a diferentes tiempos post infección, la cantidad de proteína viral y la síntesis de proteínas recién sintetizadas fueron evaluadas por WB e incorporación de S^{35} (Fig. 6.28).

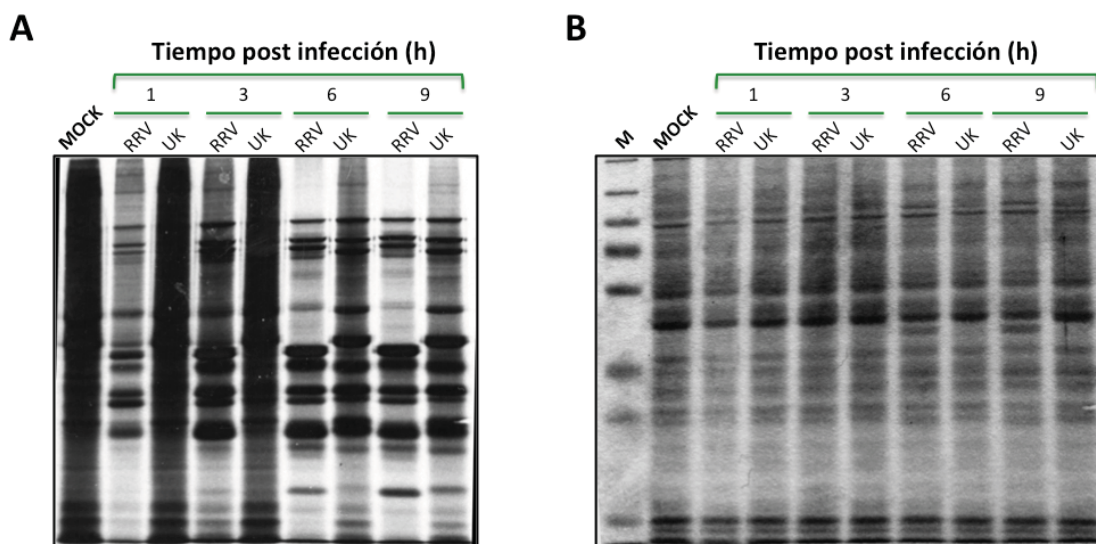


Figura 6.28: Síntesis *de novo* de proteínas celulares y virales en células infectadas con los rotavirus de las cepas UK y RRV. Células MA104 fueron infectadas a una MOI de 10 con los rotavirus de las cepas UK y RRV durante los tiempos indicados. Treinta minutos antes de finalizar el tiempo de infección, las células fueron marcadas durante 30 minutos con 25 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de Easy Tag Express S^{35} y posteriormente lisadas empleando buffer Laemmli. Las proteínas marcadas fueron resueltas por SDS-PAGE y detectadas por autorradiografía (A). La tinción con azul de Coomassie se realizó como un control de carga para cada uno de los puntos analizados (B). Geles representativos de 4 experimentos independientes.

Es claro que desde la primera hora post infección se puede detectar la síntesis de proteínas virales en las células infectadas con RRV, lo que no es tan notorio en la infección con UK y es difícil determinar si en las primeras 3h de infección hay síntesis de las proteínas virales. A las 6 y 9 hpi, la síntesis de proteínas virales de UK es evidente, y la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas virales es comparable con la observada en la infección con RRV. Dado que la VP3 es la proteína importante en el control del complejo OAS/RNasa L en tiempos tardíos de la infección, las diferencias en la acumulación de proteínas virales al inicio de la infección podrían sugerir que a los tiempos en donde la VP3 se requiere para un control eficiente de la vía, ésta aún no se encuentra en cantidades necesarias en la infección con UK. Estos resultados fueron confirmados al evaluar por WB la cantidad de proteína total sintetizada a diferentes tiempos post infección (Figura 6.29). Como se observa en dicha figura, la cantidad de VP3 apenas es visible en la infección por UK a las 6 hpi, mientras que en las células infectadas con RRV esta proteína es fácilmente detectable desde las 3 hpi. En conjunto, estos datos apuntan a que la falta de control en la degradación de los rRNA observada en las células infectadas y transfectadas al mismo tiempo con dsRNA, es debida a

que la proteína VP3 no se encuentra en las cantidades suficientes para controlar esta respuesta celular durante la infección con UK.

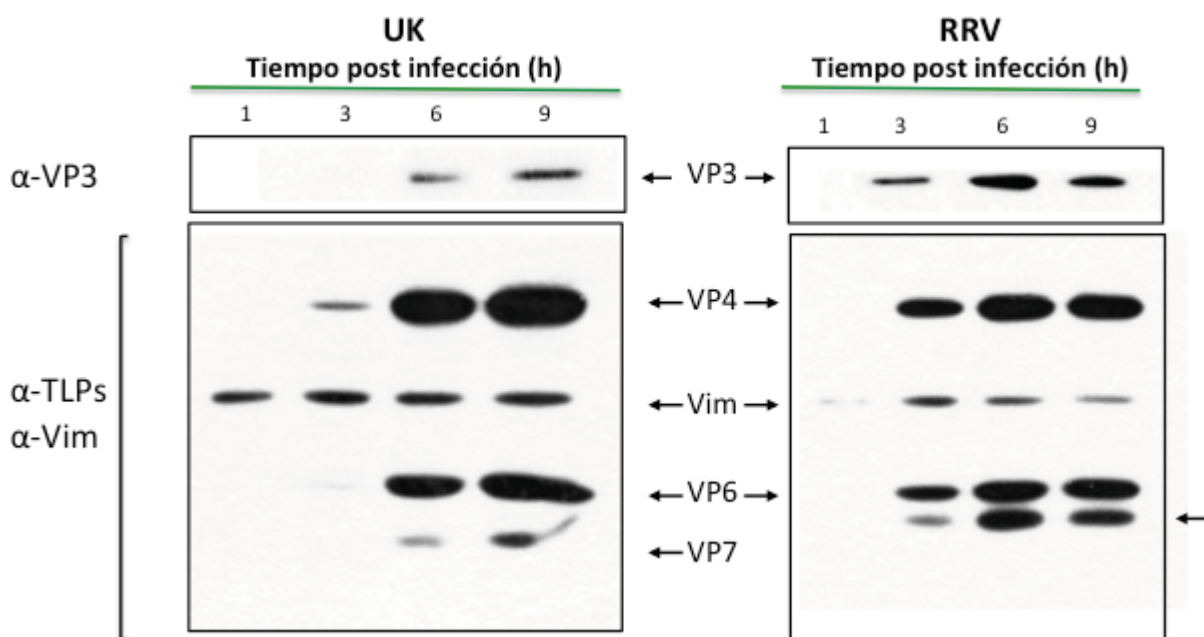


Figura 6.29: Ensayos tipo western blot para determinar la cantidad total de proteína viral producida durante la infección de los rotavirus de las cepas UK y RRV. Células MA104 fueron infectadas a una MOI de 10 con los rotavirus de las cepas RRV y UK durante los tiempos indicados. Finalizado el tiempo de infección, las células fueron lisadas empleando buffer Laemmli. Las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE y procesadas para ensayos tipo Western blot, los anticuerpos empleados son indicados en la figura. El anticuerpo α -vimentina se usó como control de carga.

VII. DISCUSIÓN

Para que los virus puedan completar su ciclo infeccioso de manera exitosa, deben sobrepasar los mecanismos de defensa de sus hospederos. Para esto, los virus han desarrollado diversas estrategias que les permiten contender con tales mecanismos. Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, los IFN son la primera línea de defensa contra las infecciones virales y son parte fundamental de la respuesta inmune innata. No obstante, su papel en la infección con RVs no es del todo comprendida. Hasta el momento, es claro que en humanos y otros mamíferos, la infección con rotavirus induce la respuesta mediada por IFN, sin embargo su importancia en el control de la infección y de la enfermedad es controversial. También es claro que la sensibilidad o resistencia a los IFNs depende del contexto celular y las cepas virales. Por ejemplo, la replicación de la cepa bovina UK en fibroblastos murinos está restringida por la respuesta de los IFNs, mientras que la cepa de simio RRV es insensible a tal respuesta en el mismo contexto celular ([3](#), [4](#), [47](#)).

En este trabajo caracterizamos como la vía antiviral OAS/RNasa L, uno de los mecanismos efectores de la respuesta de IFN, es activada durante la replicación de rotavirus en células MA104. Encontramos que los rotavirus son capaces de controlar la activación de la RNasa L, al menos por dos mecanismos diferentes. El primero ocurre en tiempos tempranos de la infección, durante las primeras interacciones virus-célula, en donde las proteínas de la capa externa VP4 y/o VP7, están involucradas. Esta observación se basa en los resultados obtenidos al infectar células con TLPs y con virus inactivados. Ambos tipos de partículas son capaces de prevenir la degradación de los rRNAs inducida por el dsRNA. En contraste, al lipofectar células con DLPs (que carecen de las proteínas de la capa externa), no observamos el control del complejo en tiempos tempranos de la infección. Este fenómeno se observó también en los ensayos con SIPs, lo cual sugiere fuertemente que VP4 es la proteína responsable de este control en tiempos tempranos de la infección, aunque aún cabe la posibilidad de la participación de VP7. Con estos resultados, proponemos que las interacciones iniciales entre las proteínas de la capa externa de la partícula viral con sus receptores celulares desencadenan un proceso celular que culmina en la inactivación de la

RNasa L, pese a la presencia de los activadores de la misma (dsRNA o 2'5-A). La identidad de los elementos celulares involucrados en esta primera inhibición aún es desconocida, pero cualquiera de los receptores y co-receptores celulares que participen en las primeras interacciones virus-célula podría estar facilitando dicho proceso inhibitorio, como por ejemplo, el ácido siálico, las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_x\beta_2$, la proteína de choque térmico hsc70 o bien la proteína JAM-A. Previamente se había reportado que la sola entrada de rotavirus a su célula hospedera es el evento mínimo necesario para que se monte una respuesta antiviral. En ese trabajo encontraron que partículas inactivadas de RVs indujeron la producción de la proteína antiviral p16, sin la necesidad de síntesis de proteínas o ácidos nucleicos virales (69); por lo que la hipótesis de que los rotavirus controlen la vía OAS/RNasa L desde la entrada a su célula huésped, es acorde a lo previamente observado para RVs. Por otra parte, se ha reportado la participación de ciertas integrinas en mecanismos involucrados en la inducción de estados refractarios de la célula que involucran la participación de los dominios ITIM (87-90). Las interacciones de VP4 con las integrinas podrían ser las responsables de iniciar un mecanismo celular capaz de inhibir la respuesta de la RNasa L, aún en presencia de sus activadores.

El segundo mecanismo antagónico del complejo OAS/RNasa L se pone en marcha una vez que la síntesis de las proteínas virales inicia. La proteína VP3, recién sintetizada, es capaz de degradar a los 2'5-A con su actividad de PDE, lo que previene la dimerización y activación de la RNasa L. Encontramos que las TLPs, DLPs y SIPs son partículas que cuentan con esta capacidad moduladora en tiempo tardíos de la infección, mientras que las partículas inactivadas, así como las tratadas con los anticuerpos neutralizantes, pese a que son capaces de mediar la inhibición de la RNasa L en tiempos tempranos de la infección, al no poder sintetizar nuevas proteínas virales, no controlan la activación de la RNasa L, evidenciando así la importancia de la síntesis de la VP3 para el control eficiente de la vía antiviral OAS/RNasa L. Tradicionalmente se ha asumido que la principal actividad de la VP3 en el ciclo infeccioso de los RVs es la adición del Cap en el extremo 5' de los transcritos virales (64). Evidencias recientes sugieren que este proceso es poco eficiente y que sólo una pequeña fracción de la población de transcritos virales contienen Cap. Por tal motivo, se ha propuesto que los

transcritos virales carentes de Cap podrían ser los patrones moleculares responsables; en parte, de activar la respuesta antiviral contra los rotavirus en las células infectadas (91). La recién descrita actividad de VP3 como PDE que le permite degradar a los 2'5-A para prevenir la activación de la RNasa L, hace sentido con los reportes previos que proponen a VP3 como un factor de virulencia, que permite al virus evadir la respuesta inmune (47, 63).

Para determinar la relevancia biológica de la actividad de VP3 como PDE, así como su actividad de guanilil-metil-transferasa en el ciclo replicativo de los RVs se silenciaron simultáneamente las proteínas VP3 y RNasa L, bajo el supuesto de que en ausencia de la RNasa L, se podría evaluar la importancia de la actividad de guanilil-metil-transferasa de VP3. Previo a este trabajo se había caracterizado el efecto sobre la progenie viral, transcritos virales y dsRNA en ausencia de VP3 y VP1, lo cual resulta en una drástica disminución en dichos productos (79). La explicación de este fenotipo no fue fácil, ya que se esperaba que en ausencia de VP3 la síntesis de proteínas virales resultara drásticamente afectada, debido a la ausencia de la estructura Cap en los transcritos virales, sin embargo la síntesis de proteínas virales no se afectó. Hay una serie de resultados que sugieren que la traducción de los mensajeros de RVs podría ser Cap independiente. En nuestro grupo de trabajo hemos observado que al silenciar de manera individual a las proteínas que forman parte del complejo del inicio de la traducción, incluida la proteína eIF4E (proteína de unión al Cap), la síntesis de proteínas virales no se ve afectada.

Al silenciar simultáneamente a las proteínas VP3 y RNasa L, encontramos que en ausencia de la RNasa L, los niveles de los transcritos virales se restablece. Es importante hacer notar que en estas condiciones, la actividad de guanilil-metil-transferasa de VP3 está drásticamente disminuida, no obstante ni la cantidad de transcritos ni la producción de partículas virales infecciosas se ve afectada. Estos ensayos también sugieren que los mRNAs sin Cap pueden ser encapsidados y a partir de ellos se pueden ensamblar nuevas partículas virales infecciosas o bien podrían evidenciar las funciones del Cap, no relacionadas ni con la estabilidad de los mensajeros ni con su traducción, y que con ciertos virus se han asociado al promover el ensamble de partículas infecciosas. Para poder distinguir entre estas dos hipótesis, será necesario cuantificar el Cap de las partículas ensambladas en ausencia de VP3 y compararlo

VIII. CONCLUSIONES

- La vía OAS/RNasa L tiene actividad antiviral frente a la infección por los rotavirus de las cepas RRV y UK.
- Los rotavirus de la cepa RRV modulan la vía OAS/RNasa L mediante un proceso multifactorial de al menos dos etapas:
 - a) *en tiempos tempranos de la infección*; en donde las proteínas de la capa externa VP4 y/o VP7 están involucradas.
 - b) *en tiempos tardíos de la infección*, en donde la VP3 recién sintetizada toma el control de la vía OAS/RNasa L.
- La actividad de VP3 como 2-fosfodiesterasa le permite catalizar la hidrólisis de los enlaces 2'5-fosfodiester de los 2'5-A, previniendo de esta manera la activación de la RNasa L.
- La síntesis *de novo* de las proteínas de capa externa (VP4/VP7) no son requeridas para el control de la vía OAS/RNasa L en tiempos tardíos de la infección de RRV.
- En la infección de células MA104 por RRV, la actividad de 2-fosfodiesterasa de la VP3 para controlar la vía OAS/RNasa L es importante para la estabilidad de los transcritos virales y la producción de partículas virales infecciosas.
- En nuestro modelo de estudio, la actividad de VP3 como metil-guanilil-transferasa no parece ser esencial en el ciclo infeccioso de los rotavirus RRV y UK, a menos a nivel del ensamble de partículas virales.
- El silenciamiento de VP3 afecta drásticamente la infectividad y el rendimiento viral de los rotavirus de la cepa bovina UK.
- El control de la vía OAS/RNasa L por UK no es tan eficiente como el de RRV.

IX. PERSPECTIVAS

- Caracterizar cómo los rotavirus de la cepa RRV modulan la vía OAS/RNasa L en tiempos tempranos de la infección:
 - a) Identificar el o los componentes virales y celulares involucrados.
 - b) Identificar los mecanismos moleculares involucrados en este control.

- Determinar las bases moleculares de las diferencias en la capacidad moduladora de la vía OAS/RNasa L por los rotavirus de la cepa RRV y UK.
 - a) Determinar por ensayos *in silico e in vitro* si hay diferencias en la actividad de PDE de la VP3 de los rotavirus de las cepas UK y RRV.

- Determinar la relevancia biológica de la actividad de VP3 como guanilil-metil-transferasa en el contexto de la infección por rotavirus.

- Caracterizar la importancia de la vía OAS/RNasa L en la infección por cepas de rotavirus que infectan humanos: Wa, YM.

- Evaluar el uso de fármacos inhibidores de las 2-PDEs en modelos animales como posible alternativa terapéutica para la gastroenteritis aguda ocasionada por los rotavirus.

- Evaluar la estructura Cap presente en el RNA encapsidado.

REFERENCIAS

1. **Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI.** 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging infectious diseases* **12**:304-306.
2. **Glass RI, Parashar U, Patel M, Gentsch J, Jiang B.** 2014. Rotavirus vaccines: successes and challenges. *The Journal of infection* **68 Suppl 1**:S9-18.
3. **Lopez S, Sanchez-Tacuba L, Moreno J, Arias CF.** 2016. Rotavirus Strategies Against the Innate Antiviral System. *Annu Rev Virol*.
4. **Sherry B.** 2009. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* **29**:559-567.
5. **Estes MK KI, Peter M. (ed), Fields virology, 5th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.** 2007. Rotaviruses. *Fields virology* **2**.
6. **Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Estes MK, Prasad BV.** 2012. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Current opinion in virology* **2**:380-388.
7. **Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV.** 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Current topics in microbiology and immunology* **309**:189-219.
8. **Trask SD, McDonald SM, Patton JT.** 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews. Microbiology* **10**:165-177.
9. **Desselberger U.** 2014. Rotaviruses. *Virus research* **190**:75-96.
10. **Bridger JC, Dhaliwal W, Adamson MJ, Howard CR.** 1998. Determinants of rotavirus host range restriction--a heterologous bovine NSP1 gene does not affect replication kinetics in the pig. *Virology* **245**:47-52.
11. **Broome RL, Vo PT, Ward RL, Clark HF, Greenberg HB.** 1993. Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence. *Journal of virology* **67**:2448-2455.
12. **McDonald SM, Patton JT.** 2011. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in microbiology* **19**:136-144.
13. **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. *Journal of virology* **84**:9161-9169.
14. **Arias CF, Silva-Ayala D, Lopez S.** 2015. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *Journal of virology* **89**:890-893.
15. **Mendez E, Arias CF, Lopez S.** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *Journal of virology* **70**:1218-1222.
16. **Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER.** 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* **181**:553-563.
17. **Lopez S, Arias CF.** 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in microbiology* **12**:271-278.
18. **Estes MK KA.** 2007. Rotavirus, vol. II.
19. **Hoffmann HH, Schneider WM, Rice CM.** 2015. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends in immunology* **36**:124-138.
20. **Schoggins JW.** 2014. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Current opinion in virology* **6**:40-46.

21. **Katze MG, He Y, Gale M, Jr.** 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature reviews. Immunology* **2**:675-687.
22. **Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J.** 2007. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* **89**:713-718.
23. **Ivashkiv LB, Donlin LT.** 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* **14**:36-49.
24. **Platanias LC.** 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology* **5**:375-386.
25. **Lasfar A, Zloza A, Cohen-Solal KA.** 2015. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug discovery today*.
26. **Sadler AJ, Williams BR.** 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews. Immunology* **8**:559-568.
27. **Randall RE, Goodbourn S.** 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of general virology* **89**:1-47.
28. **Hermant P, Michiels T.** 2014. Interferon-lambda in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *Journal of innate immunity* **6**:563-574.
29. **Kristiansen H, Gad HH, Eskildsen-Larsen S, Despres P, Hartmann R.** 2011. The oligoadenylate synthetase family: an ancient protein family with multiple antiviral activities. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**:41-47.
30. **Bisbal C, Silverman RH.** 2007. Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie* **89**:789-798.
31. **Silverman RH.** 1994. Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *Journal of interferon research* **14**:101-104.
32. **Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, Salehzada T.** 1995. Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *The Journal of biological chemistry* **270**:13308-13317.
33. **Drappier M, Michiels T.** 2015. Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses. *Current opinion in virology* **15**:19-26.
34. **Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C.** 1999. RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *Journal of virology* **73**:290-296.
35. **Liang SL, Quirk D, Zhou A.** 2006. RNase L: its biological roles and regulation. *IUBMB life* **58**:508-514.
36. **Silverman RH.** 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology* **81**:12720-12729.
37. **Kubota K, Nakahara K, Ohtsuka T, Yoshida S, Kawaguchi J, Fujita Y, Ozeki Y, Hara A, Yoshimura C, Furukawa H, Haruyama H, Ichikawa K, Yamashita M, Matsuoka T, Iijima Y.** 2004. Identification of 2'-phosphodiesterase, which plays a role in the 2-5A system regulated by interferon. *The Journal of biological chemistry* **279**:37832-37841.
38. **Gusho E, Zhang R, Jha BK, Thornbrough JM, Dong B, Gaughan C, Elliott R, Weiss SR, Silverman RH.** 2014. Murine AKAP7 Has a 2',5'-Phosphodiesterase Domain That Can Complement an Inactive Murine Coronavirus ns2 Gene. *mBio* **5**.

39. **Zhao L, Jha BK, Wu A, Elliott R, Ziebuhr J, Gorbalenya AE, Silverman RH, Weiss SR.** 2012. Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell host & microbe* **11**:607-616.
40. **Zhang R, Jha BK, Ogden KM, Dong B, Zhao L, Elliott R, Patton JT, Silverman RH, Weiss SR.** 2013. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:13114-13119.
41. **Arnold MM, Sen A, Greenberg HB, Patton JT.** 2013. The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS pathogens* **9**:e1003064.
42. **Holloway G, Coulson BS.** 2013. Innate cellular responses to rotavirus infection. *The Journal of general virology* **94**:1151-1160.
43. **Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T.** 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS pathogens* **4**:e1000017.
44. **Lasfar A, Zloza A, Cohen-Solal KA.** 2016. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug discovery today* **21**:167-171.
45. **Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, Staeheli P, Hornef MW.** 2011. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:7944-7949.
46. **Arnold MM, Barro M, Patton JT.** 2013. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *Journal of virology* **87**:9813-9821.
47. **Morelli M, Ogden KM, Patton JT.** 2015. Silencing the alarms: Innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. *Virology* **479-480**:75-84.
48. **Morelli M, Dennis AF, Patton JT.** 2015. Putative E3 ubiquitin ligase of human rotavirus inhibits NF-kappaB activation by using molecular mimicry to target beta-TrCP. *mBio* **6**.
49. **Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME.** 2002. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *Journal of virology* **76**:9545-9550.
50. **Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME.** 2009. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS pathogens* **5**:e1000280.
51. **Kumar KG, Krolewski JJ, Fuchs SY.** 2004. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *The Journal of biological chemistry* **279**:46614-46620.
52. **Cui W, Xiao N, Xiao H, Zhou H, Yu M, Gu J, Li X.** 2012. beta-TrCP-mediated IRAK1 degradation releases TAK1-TRAF6 from the membrane to the cytosol for TAK1-dependent NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biology* **32**:3990-4000.
53. **Bagchi P, Bhowmick R, Nandi S, Kant Nayak M, Chawla-Sarkar M.** 2013. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFkappaB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology* **444**:41-44.

54. **Qin L, Ren L, Zhou Z, Lei X, Chen L, Xue Q, Liu X, Wang J, Hung T.** 2011. Rotavirus nonstructural protein 1 antagonizes innate immune response by interacting with retinoic acid inducible gene I. *Virology journal* **8**:526.
55. **Nandi S, Chanda S, Bagchi P, Nayak MK, Bhowmick R, Chawla-Sarkar M.** 2014. MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1. *PloS one* **9**:e92126.
56. **Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M.** 2013. Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *Journal of virology* **87**:6840-6850.
57. **Holloway G, Dang VT, Jans DA, Coulson BS.** 2014. Rotavirus inhibits IFN-induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin-alpha. *The Journal of general virology* **95**:1723-1733.
58. **Groft CM, Burley SK.** 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular cell* **9**:1273-1283.
59. **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.
60. **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. *Journal of virology* **74**:7064-7071.
61. **Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, Lopez S.** 2013. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *Journal of virology* **87**:6336-6345.
62. **Ogden KM, Snyder MJ, Dennis AF, Patton JT.** 2014. Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3. *Journal of virology* **88**:9072-9085.
63. **Hoshino Y, Saif LJ, Kang SY, Sereno MM, Chen WK, Kapikian AZ.** 1995. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology* **209**:274-280.
64. **Chen D, Luongo CL, Nibert ML, Patton JT.** 1999. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* **265**:120-130.
65. **Mazumder R, Iyer LM, Vasudevan S, Aravind L.** 2002. Detection of novel members, structure-function analysis and evolutionary classification of the 2H phosphoesterase superfamily. *Nucleic acids research* **30**:5229-5243.
66. **Schuessler A, Funk A, Lazear HM, Cooper DA, Torres S, Daffis S, Jha BK, Kumagai Y, Takeuchi O, Hertzog P, Silverman R, Akira S, Barton DJ, Diamond MS, Khromykh AA.** 2012. West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. *Journal of virology* **86**:5708-5718.
67. **Lukacs N.** 1994. Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA. *Journal of virological methods* **47**:255-272.
68. **Rojas M, Arias CF, Lopez S.** 2010. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *Journal of virology* **84**:10457-10466.

69. **Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB.** 2011. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *Journal of virology* **85**:3717-3732.
70. **Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH.** 2011. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**:49-57.
71. **Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH.** 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**:816-819.
72. **Kristiansen H, Scherer CA, McVean M, Iadonato SP, Vends S, Thavachelvam K, Steffensen TB, Horan KA, Kuri T, Weber F, Paludan SR, Hartmann R.** 2010. Extracellular 2'-5' oligoadenylate synthetase stimulates RNase L-independent antiviral activity: a novel mechanism of virus-induced innate immunity. *Journal of virology* **84**:11898-11904.
73. **Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, Deal EM, Greenberg HB.** 2009. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *Journal of virology* **83**:6987-6994.
74. **Mendez E, Arias CF, Lopez S.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *Journal of virology* **67**:5253-5259.
75. **Pando V, Isa P, Arias CF, Lopez S.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190-200.
76. **Groene WS, Shaw RD.** 1992. Psoralen preparation of antigenically intact noninfectious rotavirus particles. *Journal of virological methods* **38**:93-102.
77. **Liu W, Liang SL, Liu H, Silverman R, Zhou A.** 2007. Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model. *European journal of cancer* **43**:202-209.
78. **Martinand C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C.** 1998. The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **18**:1031-1038.
79. **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. *Journal of virology* **83**:8819-8831.
80. **Sorgeloos F, Jha BK, Silverman RH, Michiels T.** 2013. Evasion of antiviral innate immunity by Theiler's virus L* protein through direct inhibition of RNase L. *PLoS pathogens* **9**:e1003474.
81. **Philpott N, Bakken T, Pennell C, Chen L, Wu J, Cannon M.** 2011. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif that activates Shp2. *Journal of virology* **85**:1140-1144.
82. **Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF.** 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO reports* **3**:1175-1180.
83. **Ludert JE, Ruiz MC, Hidalgo C, Liprandi F.** 2002. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *Journal of virology* **76**:6643-6651.

84. **Lopez S, Espinosa R, Isa P, Merchant MT, Zarate S, Mendez E, Arias CF.** 2000. Characterization of a monoclonal antibody directed to the surface of MA104 cells that blocks the infectivity of rotaviruses. *Virology* **273**:160-168.
85. **Silverman RH.** 2007. A scientific journey through the 2-5A/RNase L system. *Cytokine & growth factor reviews* **18**:381-388.
86. **Uzri D, Greenberg HB.** 2013. Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors. *PloS one* **8**:e69825.
87. **Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH.** 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**:288-300.
88. **Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS.** 2000. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *Journal of virology* **74**:228-236.
89. **Cox D, Brennan M, Moran N.** 2010. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* **9**:804-820.
90. **Hynes RO.** 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**:673-687.
91. **Arnold MM.** 2016. The rotavirus interferon antagonist NSP1: many targets, many questions. *Journal of virology*.
92. **Sokoloski KJ, Haist KC, Morrison TE, Mukhopadhyay S, Hardy RW.** 2015. Noncapped Alphavirus Genomic RNAs and Their Role during Infection. *Journal of virology* **89**:6080-6092.

ANEXO I

Artículo publicado en "Journal of Virology":

***Rotavirus Controls Activation of the 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase/ RNase L Pathway
Using at Least Two Distinct Mechanisms***



Rotavirus Controls Activation of the 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase/RNase L Pathway Using at Least Two Distinct Mechanisms

Liliana Sánchez-Tacuba, Margarito Rojas,  Carlos F. Arias, Susana López

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

ABSTRACT

The innate immune response is the first line of defense of the host cell against a viral infection. In turn, viruses have evolved a wide variety of strategies to hide from, and to directly antagonize, the host innate immune pathways. One of these pathways is the 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS)/RNase L pathway. OAS is activated by double-stranded RNA (dsRNA) to produce 2'-5'-oligoadenylates, which are the activators of RNase L; this enzyme degrades viral and cellular RNAs, restricting viral infection. It has been recently found that the carboxy-terminal domain (CTD) of rotavirus VP3 has a 2'-5'-phosphodiesterase (PDE) activity that is able to functionally substitute for the PDE activity of the mouse hepatitis virus ns2 protein. This particular phosphodiesterase cleaves the 2'-5'-phosphodiester bond of the oligoadenylates, antagonizing the OAS/RNase L pathway. However, whether this activity of VP3 is relevant during the replication cycle of rotavirus is not known. Here, we demonstrate that after rotavirus infection the OAS/RNase L complex becomes activated; however, the virus is able to control its activity using at least two distinct mechanisms. A virus-cell interaction that occurs during or before rotavirus endocytosis triggers a signal that prevents the early activation of RNase L, while later on the control is taken by the newly synthesized VP3. Cosilencing the expression of VP3 and RNase L in infected cells yields viral infectious particles at levels similar to those obtained in control infected cells, where no genes were silenced, suggesting that the capping activity of VP3 is not essential for the formation of infectious viral particles.

IMPORTANCE

Rotaviruses represent an important cause of severe gastroenteritis in the young of many animal species, including humans. In this work, we have found that the OAS/RNase L pathway is activated during rotavirus infection, but the virus uses two different strategies to prevent the deleterious effects of this innate immune response of the cell. Early during virus entry, the initial interactions of the viral particle with the cell result in the inhibition of RNase L activity during the first hours of the infection. Later on, once viral proteins are synthesized, the phosphodiesterase activity of VP3 degrades the cellular 2'-5'-oligoadenylates, which are potent activators of RNase L, preventing its activation. This work demonstrates that the OAS/RNase L pathway plays an important role during infection and that the phosphodiesterase activity of VP3 is relevant during the replication cycle of the virus.

Rotaviruses, an important cause of severe gastroenteritis in the young of many animal species, including humans, are nonenveloped viruses formed by a triple-layered capsid surrounding the viral genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA). After entering the cell, the incoming rotavirus particle is uncoated, losing the outermost-layer proteins, VP4 and VP7, yielding a transcriptionally active double-layered particle (DLP) that consists of VP6 and the core proteins VP2, VP1, and VP3. The viral RNA transcripts encode six structural and six nonstructural proteins (1). These transcripts also serve as the templates for the synthesis of RNA negative strands to form the dsRNA genomic segments. Naked genomic viral dsRNA genome is never exposed in the cytoplasm, since it is transcribed and replicated inside replication intermediate particles by VP1, the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and capped by VP3, the guanylyl- and methyltransferase of the virion (2). The replication of the viral RNA and the initial morphogenesis of the virions take place in viroplasm (perinuclear, electron-dense cytoplasmic structures), concurrently with the packaging of RNA transcripts into core-replication intermediate particles (3). This process leads to the production of new, transcriptionally active DLPs that initiate an enhanced second round of transcription (4).

The host response to viral dsRNA is a key component of the interferon (IFN) system and represents the first line of defense of

the cells against virus infection. Viruses have evolved different strategies to hide their genetic material from the cell sensors. If detected, however, viruses have also developed a series of countermeasures to prevent the deleterious effects of the antiviral responses of the cell (5, 6). During rotavirus replication, the genomic dsRNA hides from the IFN system within replication intermediates immersed in viroplasm. However, several findings suggest that rotaviral RNAs, most probably highly structured viral transcripts or uncapped viral mRNAs, are exposed to cell sensors at some point during the replication cycle: viral dsRNA has been detected in the cytoplasm of infected cells by a monoclonal antibody (MAb) that recognizes dsRNA stretches longer than 40 bases (7), the RNA sensors RIG-I and MDA5 are activated and mediate the

Received 23 July 2015 Accepted 17 September 2015

Accepted manuscript posted online 23 September 2015

Citation Sánchez-Tacuba L, Rojas M, Arias CF, López S. 2015. Rotavirus controls activation of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L pathway using at least two distinct mechanisms. *J Virol* 89:12145–12153. doi:10.1128/JVI.01874-15.

Editor: T. S. Dermody

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

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on November 5, 2015 by UNAM-UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

IFN response in the rotavirus-infected cell (8, 9), and the dsRNA-dependent kinase PKR is activated and phosphorylates translation factor eIF2 α (α subunit of eukaryotic initiation factor 2) (10).

The presence of cytoplasmic dsRNA also triggers the activation of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L (OAS/RNase L) pathway, which catalyzes the degradation of most RNAs, contributing to a general shutoff of the protein synthesis (11). dsRNA induces the oligomerization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS), activating it. Active OAS synthesizes 2'-5'-oligoadenylates (2-5 A) by using ATP as a substrate; in turn, 2-5 A bind with high specificity and affinity to monomeric, inactive RNase L, inducing its dimerization and its activation. This RNase cleaves within single-stranded regions of cellular or viral RNA, mainly on the 3' sides of UpAp and UpUp dinucleotides, leaving 3-phosphoryl and 5-hydroxyl groups at the termini of the RNA cleavage products (11).

It was recently reported that the carboxy-terminal domain (CTD) of rotavirus strain SA11 VP3 has a 2'-5'-phosphodiesterase (2-5-PDE) activity, similar to that of the ns2 protein of the coronavirus mouse hepatitis virus (MHV), which antagonizes the antiviral activity of RNase L by degrading 2-5 A (12, 13). By sequence analysis, ns2 and VP3 were predicted to be members of a LigT-like family of the 2H phosphodiesterase superfamily. The members of this superfamily are characterized by the presence of 2 conserved catalytic histidine residues and include both viral and cellular proteins of diverse origins (14). It has been shown that the VP3 CTD has PDE activity *in vitro* and when transiently expressed in mammalian cells. Furthermore, the VP3 CTD is able to functionally substitute for ns2 during MHV infection (13). More recently, the CTD of rotavirus strain rhesus rotavirus (RRV) has been cocrystallized with its substrate 2-5 A, and its *in vitro* activity has been demonstrated elsewhere (15). However, the role of this activity of VP3 during rotavirus infection has not been explored.

Since several dsRNA-induced mechanisms are triggered during rotavirus infection, in this work we studied whether the OAS/RNase L pathway is activated in rotavirus-infected cells and also characterized the strategies used by the virus to counteract this cellular defense system. We found that during infection the OAS/RNase L pathway is activated; however, rotavirus is able to counteract this system using at least two mechanisms. The first prevents the early activation of the pathway during virus entry, and in the second mechanism the PDE activity of VP3 plays an important role to control the activation of RNase L.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and viruses. The rhesus kidney epithelial cell line MA104 (ATCC), grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-reduced serum (Thermo Scientific HyClone, Logan, UT) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Kansas City, MO) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, was used for all experiments carried out in this work. The simian rotavirus strain RRV used in this work has been described previously (16) and was propagated in MA104 cells as described previously (17). Prior to infection, rotavirus cell lysates were activated with 10 μ g/ml of trypsin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA) for 30 min at 37°C. For some assays, RRV was inactivated by treatment with psoralen and UV as previously reported (18). Briefly, an RRV lysate was mixed with psoralen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to a final concentration of 40 μ g/ml and was exposed to a UV lamp for 2 h on ice. To verify the inactivation, the titer of the UV-psoralen-treated virus was determined by an immunoperoxidase focus assay, and the integrity of the

viral particles was determined by a hemagglutination assay. Inactivated RRV is here referred to as iRRV.

Reagents and antibodies. The small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO). The sequences of the siRNAs against the rotavirus genes used in this work have been previously reported (10). As an irrelevant control, the siGENOME nontargeting siRNA 3 from Dharmacon was used. A monoclonal antibody (MAb) to RNase L and polyclonal antibodies to OAS1 and OAS3 were obtained from Abcam (Cambridge, MA). Rabbit hyperimmune sera to rotavirus VP1 (anti-VP1), to NSP5 (anti-NSP5), and to a recombinant human vimentin (anti-Vim) were produced in our laboratory. MAb 159 was kindly donated by H. B. Greenberg, Stanford University; Stanford, CA, and MAb HS2 was previously described (19). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal and anti-mouse antibodies were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). The 5'-phosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates (2-5 A) were kindly provided by R. Silverman (Cleveland Clinic, Cleveland, OH).

Transfection of siRNAs, poly(I-C), dsRNA, and 2-5 A. Transfection and cotransfection of siRNAs into MA104 cells were performed in 48-well plates using a reverse transfection method as described previously (20). To transfect poly(I-C), dsRNA, or 2-5 A, MA104 cells previously transfected or not with the indicated siRNAs were incubated for 1 h at 37°C with minimum essential medium (MEM) containing Lipofectamine 2000 (26.66 μ l/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) and 5 μ g/ml of synthetic poly(I-C) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10 μ g/ml of purified viral dsRNA, or 2.5 μ M 2-5 A. After this time, the transfection mixture was replaced with MEM and the cells were incubated for different times at 37°C before harvesting. None of the siRNAs tested were toxic for the cells, as determined by a lactate dehydrogenase (LDH) release assay, using a commercial kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO).

Radio-labeling of proteins. Cells grown in 48-well plates, transfected or not with siRNAs, were mock infected or infected with rotavirus at a multiplicity of infection (MOI) of 10. At different times postinfection, the medium was replaced by MEM without methionine supplemented with 25 μ Ci/ml of Easy Tag Express ³⁵S labeling mix (Dupont NEN, Boston, MA) and incubated for 30 min at 37°C. Cells were lysed in Laemmli sample buffer, and the samples were resolved by 6% or 10% SDS-PAGE, followed by autoradiography.

Immunoblot analysis. Cells were lysed in Laemmli sample buffer and denatured by boiling for 5 min. Proteins in cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon NC (Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany) membranes. The membranes were blocked by incubation with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature and with primary antibodies diluted in PBS containing 5% milk, followed by incubation with secondary, species-specific, horseradish peroxidase-conjugated antibodies, as previously reported (20). The peroxidase activity was developed using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) according to the manufacturer's instructions. The blots were also probed with an antivimentin antibody, which was used as a loading control.

rRNA cleavage assays. Total cellular RNA was isolated at different times postinfection using the PureLink RNA minikit (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA). RNA was quantitated using a NanoDrop analyzer, and equal amounts of RNA were loaded and resolved on RNA chips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using an Agilent 2100 Bioanalyzer. To quantitate the activity of RNase L, the bands corresponding to 18S and 28S rRNAs and their degradation products were calculated using the Eukaryote Total RNA Nano software (version 2.61).

Triple-layered particles (TLPs), DLPs, spikeless particles, and dsRNA purification. MA104 cells grown in 150-cm² flasks were infected as described previously and were harvested 14 h postinfection (hpi), the viral lysates were freeze-thawed three times, and viral particles were concentrated by ultracentrifugation for 1 h at 30,000 rpm at 4°C in an SW40 rotor (Beckman, Fullerton, CA). To obtain spikeless particles, cells were

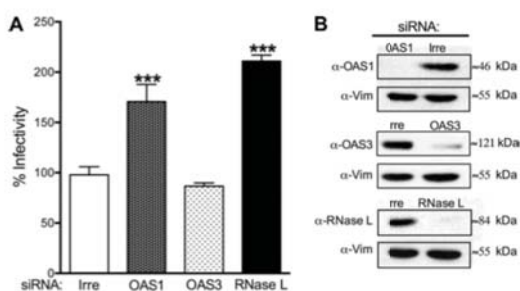


FIG 1 The yield of infectious virus increases when the expression of OAS1 and RNase L is silenced. (A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs and 72 h posttransfection were infected with RRV at an MOI of 3. At 12 hpi, cells were lysed and the virus titer was determined by an immunoperoxidase focus-forming assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentages of the infectivity obtained when the cells were transfected with an irrelevant siRNA (Irre), which was taken as 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisk indicates significant differences between the infectivities of irrelevant and OAS1, OAS3, and RNase L siRNA-transfected cells (***, $P \leq 0.001$). (B) Representative immunoblot analysis of cell lysates from cells transfected with the indicated siRNAs. Expression of OAS1, OAS3, and RNase L was detected with the indicated antibodies. Vimentin (Vim) was used as a loading control.

transfected with an siRNA directed to VP4 (21) for 72 h before rotavirus infection.

The viral pellets were resuspended in TNC buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂), sonicated three times for 20 s, extracted with Genetron (trichloromonofluoroethane), and used to obtain either genomic viral dsRNA or viral particles. To obtain genomic dsRNA, the virus suspension was pelleted through a 40% sucrose cushion by centrifugation for 1 h at 30,000 rpm at 4°C in a SW40 rotor, and viral dsRNA was isolated from the pellet by extraction with phenol-chloroform. To purify viral particles (DLPs, TLPs, and spikeless particles), CsCl was added to the aqueous phase obtained from the Genetron extraction to obtain a density of 1.36 g/cm³, the mixture was centrifuged for 18 h at 36,000 rpm in a SW55 Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA) at 4°C, and the opalescent bands corresponding to TLPs, spikeless particles, and DLPs were collected by puncture. The band corresponding to DLPs was diluted in TNE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 5 mM EGTA) to remove the remaining outer layer proteins of the particles, and the viral particles were pelleted as described above.

Lipofection of DLPs and spikeless particles. Confluent cells were transfected with DLPs or spikeless particles using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) as previously described (7). Briefly, DLPs (10 μ g/ml) or spikeless particles (15 μ g/ml) were diluted in MEM and incubated with a mixture of Lipofectamine in MEM for 20 min at room temperature. One hundred microliters of this mixture was added to the cells for 1 h at 37°C, and then cells were washed with MEM. Cells were lysed at different times postlipofection.

Northern blotting. Total cellular RNA was isolated using TRIzol reagent (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA), separated on a 5% acrylamide-8 M urea-Tris-borate EDTA (TBE) gel, and transferred to Hybond-N⁺ membranes (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom); the transferred RNA was UV cross-linked twice and probed with a ³²P-labeled oligonucleotide (5'-GAGCAATCTTCATGGTTGGAA3') complementary to RRV gene 10 or with oligonucleotide 5'-CTCTGGTGGTGGCCCTTC3', complementary to the 18S rRNA, which was used as a loading control. Both oligonucleotides were labeled using [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA). Hybridizations were performed at 42°C for 19 h in ULTRA-

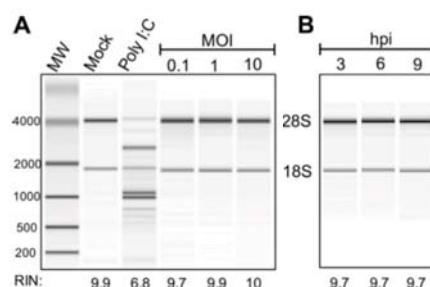


FIG 2 rRNA is not degraded during rotavirus infection. MA104 cells were mock infected or infected with RRV at the indicated MOIs or transfected with 5 μ g/ml of poly(I:C) for 6 h (A) or infected at an MOI of 10 and harvested at the indicated times (B). Total RNA was extracted, and rRNA integrity was analyzed on the Agilent Bioanalyzer system; the migrations of 18S and 28S rRNAs are indicated. Data shown are from one representative of at least two independent experiments. The RNA integrity number (RIN) was determined using the Bioanalyzer system. MW, molecular weight.

hybR-OligoHybridization buffer (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA). Hybridized membranes were washed twice in 2 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) with 0.1% SDS for 30 min each time and then exposed to the Phosphor Screen system (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). The intensity of each hybridization band was quantified by densitometry using Image J (version 2.0.0).

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's multiple comparison posttest using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

RESULTS

The OAS/RNase L pathway becomes active during rotavirus infection. To determine if the OAS/RNase L pathway plays a role during the infection cycle of rotaviruses, we silenced the expression of OAS1, OAS3, and RNase L by RNA interference (RNAi) and characterized the effect of their knockdown on viral infectivity. In these experiments, MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs, and 72 h posttransfection, the cells were mock infected or infected with the simian rotavirus strain RRV. Twelve hours postinfection, cells were lysed, the amount of infectious virus produced was determined by an immunoperoxidase focus-forming assay (Fig. 1A), and the effectiveness of the silencing was assessed by Western blotting (Fig. 1B). We found that while silencing the expression of OAS3 did not significantly affect the infectivity of RRV, the knockdown of OAS1 and RNase L resulted in about a 2-fold increase in viral infectivity, suggesting that this pathway has a slight deleterious effect during rotavirus infection.

The activation of the OAS/RNase L pathway has as a consequence the degradation of RNA, which can be assessed by the integrity of rRNAs (22). To characterize the level of activation of this pathway during the infection process, we evaluated the integrity of rRNAs in cells infected with RRV at different MOIs, compared with that of mock-infected cells, by RNA chip analysis using an Agilent Bioanalyzer. As a control for activation, we transfected the cells with poly(I:C), which is a well-characterized inducer of the OAS/RNase L pathway. We found that while transfection of cells with poly(I:C) induced a clear degradation of the 18S and 28S rRNAs, no rRNA degradation was observed in cells that were infected with different MOIs of rotavirus RRV (Fig. 2A) or harvested at different times postinfection (Fig. 2B).

Sánchez-Tacuba et al.

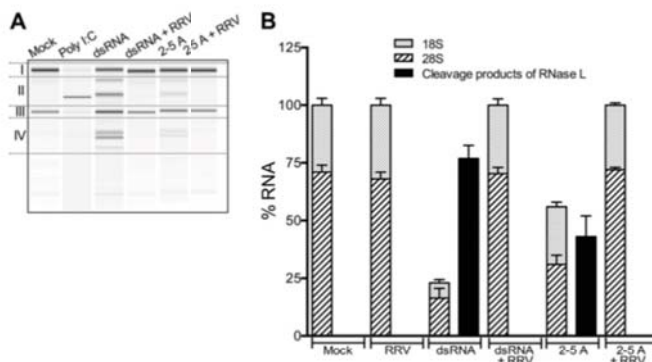


FIG 3 RRV infection prevents the degradation of rRNAs induced by dsRNA or 2-5 A. (A) MA104 cells were mock infected or infected with RRV (MOI of 10) and transfected with 5 μ g/ml of poly(I:C), 10 μ g/ml of purified rotavirus dsRNA (dsRNA), or 2.5 μ M 2-5 A. At 9 hpi, the cells were lysed, and total RNA was purified and analyzed on the Agilent Bioanalyzer system. (B) The cleavage products of 18S and 28S rRNAs were quantitated under each condition, using the Bioanalyzer system as described in Materials and Methods. To average biological replicates run in the Bioanalyzer, the areas below the curves of the regions corresponding to 18S, 28S, between 18S and 28S, and below 18S (indicated by roman numerals I to IV) were calculated from the electropherogram, and their sum was taken as 100%. The fraction represented by each band was then calculated. Data show the arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments.

The rRNA degradation triggered by dsRNA or 2-5 A is prevented during rotavirus infection. We next explored if the lack of degradation of rRNA observed in rotavirus-infected cells was due to a lack of activation of the pathway or to an inhibition of the activity of RNase L. For this, mock-infected or RRV-infected MA104 cells were transfected with either purified viral dsRNA or 2-5 A, and at 9 hpi total RNA was extracted and analyzed for its integrity as indicated above. We found that while there was a clear degradation of rRNAs in cells transfected with either dsRNA or 2-5 A, when the transfected cells were infected with rotavirus at the same time, the degradation of rRNAs was prevented (Fig. 3A and B). These results suggest that the degradation of rRNAs induced by the OAS/RNase L pathway appears to be prevented during RRV infection. The observation that the degradation of rRNAs was prevented when 2-5 A were used suggests that the control exerted by the virus infection was at the level of preventing the activation of RNase L.

Rotavirus infection counteracts the OAS/RNase L pathway by at least two different mechanisms. To characterize the mechanism through which rotavirus prevents the activation of the OAS/RNase L pathway, we first studied if the entry of the virus had a role in the control of the pathway. To achieve this, cells were either infected with purified triple-layered particles (TLPs) or transfected with double-layered particles (DLPs) that lack the outer layer of the virus and are unable to enter the cells but when introduced into the cytosol by lipofection are competent to start a productive virus replication cycle. At the same time, cells were transfected or not with dsRNA and were then harvested at different times to determine the integrity of the rRNAs. Figure 4A shows that when the cells were infected with TLPs and either treated or not with dsRNA, no degradation of rRNA was detected; in contrast, when the cells were only transfected with dsRNA, there was a time-dependent increase in the amount of rRNA degradation observed. When DLPs were transfected into cells, we found that there was a limited degradation of rRNA that reached a plateau between 3 and 6 hpi. When cells were lipofected with DLPs and

with dsRNA, we found that the amount of rRNA degraded was larger and, similarly, it reached a plateau between 3 and 6 hpi, although the level of degradation achieved was less than half of that obtained when dsRNA was transfected alone. To discard the possibility that the lipofectant reagent was causing this effect, purified TLPs were mixed with Lipofectamine and used to infect cells that were transfected or not with dsRNA. In these assays, we found that there was no noticeable degradation of rRNA at any time postinfection in the presence or absence of dsRNA (results not shown), indicating that the effect observed with DLPs was not due to the lipofectant. These results suggest that the entry process of the virus might trigger a signal that prevents the early activation of the OAS/RNase L pathway. In addition, a second mechanism activated at a later stage of virus replication to control the rRNA degradation (between 3 and 6 hpi) seems to be operational.

To test whether the second step of control of rRNA degradation induced by rotavirus infection was mediated by a viral product synthesized in infected cells, cells were infected with viral particles inactivated by treatment with psoralen-UV and then transfected or not with dsRNA. These viral particles are able to bind and enter the cells, but they are unable to initiate the transcription of viral mRNAs. We found that there was no degradation of rRNA during the first 3 hpi in cells infected with UV-inactivated virions and transfected with dsRNA, but thereafter, the degradation of rRNA increased with time (Fig. 4B). Taken together, these results suggest that the entry of viral particles triggers a signal that prevents the initial degradation of rRNA, and later on, the virus has a second mechanism, which depends on the *de novo* synthesis of a viral component, to keep the RNase L inactive.

The outer layer proteins are involved in controlling the activation of RNase L. Since DLPs were unable to prevent the initial activation of RNase L, we tested whether VP4, VP7, or both were responsible for this initial control. To establish the role of VP4, we characterized the effect of transfecting spikeless particles (containing three layers of proteins formed by VP2, VP6, and VP7 but not VP4) on the degradation of rRNA. These particles were puri-

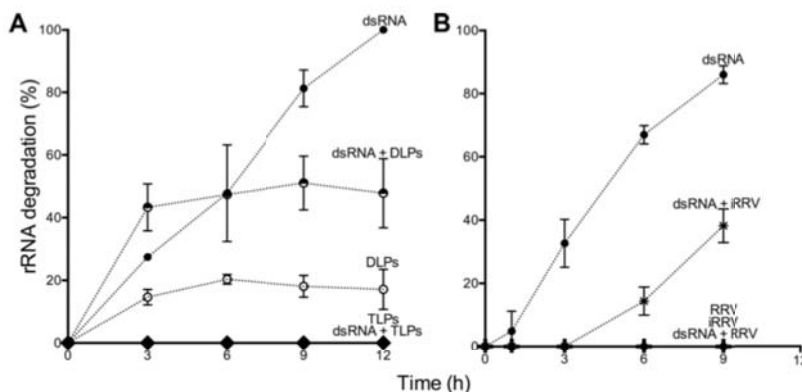


FIG 4 Rotavirus infection counteracts the OAS/RNase L pathway in at least two different steps. (A) MA104 cells were either infected with CsCl-purified TLPs or transfected with 10 μ g/ml of DLPs. At the same time, the cells were transfected or not with 10 μ g/ml of purified rotavirus dsRNA (dsRNA). At the indicated times, the cells were harvested and total RNA was purified and analyzed on a Bioanalyzer. (B) MA104 cells were infected either with RRV (MOI of 10) or with UV-psoralen-inactivated (iRRV) rotavirus and at the same time transfected or not with dsRNA (10 μ g/ml). Cells were harvested at the indicated times, and total RNA was extracted and analyzed on a Bioanalyzer. The cleavage products of RNase L were quantitated under each condition using the Bioanalyzer system as described in Materials and Methods. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments are shown.

fied from RRV-infected cells in which the expression of VP4 was silenced by RNAi (Fig. 5A, inset). We have previously shown that these particles, like DLPs, are able to establish a productive replication cycle once they are introduced into the cells by lipofection (21). We found that when these particles were transfected into MA104 cells, a limited degradation of rRNAs was observed, which seemed to reach a plateau at 3 hpi. When these particles were

transfected together with dsRNA, an increased degradation of rRNA was observed, but it also reached a plateau between 3 and 6 hpi (Fig. 5A). Interestingly, the spikeless particles behaved similarly to DLPs, suggesting that the absence of VP4 in these particles mimics the behavior of the absence of both surface layer proteins. In a different approach to evaluating the role that the internalization of the virus might have in the early control of the activity of

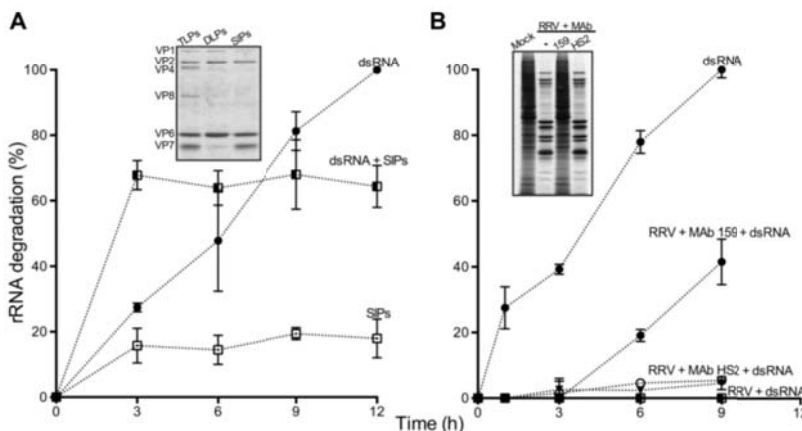


FIG 5 The entry of the viral particle prevents the early activation of RNase L. (A) MA104 cells were transfected with 15 μ g/ml of spikeless particles (SIPs), and at the same time, cells were transfected or not with 10 μ g/ml of purified rotavirus dsRNA (dsRNA). At the indicated times, the cells were harvested and total RNA was purified and analyzed on a Bioanalyzer. (B) Trypsin-treated RRV (MOI of 10) was incubated with MAb 159, MAb HS2, or PBS (as a control) for 2 h at 37°C. One hundred microliters of virus-antibody mixtures was inoculated onto MA104 cell monolayers in 48-well plates. After the adsorption period, the cells were transfected or not with 10 μ g/ml of purified rotavirus dsRNA (dsRNA). At the indicated times, the cells were harvested and total RNA was purified and analyzed on a Bioanalyzer. The cleavage products of RNase L were quantitated under each condition using the Bioanalyzer system as described in Materials and Methods. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments are shown. (Inset) To evaluate the efficiency of neutralization of MAb 159, MA104 cells were mock infected or infected with the same virus-antibody mixtures, and at 8.5 hpi, cells were labeled for 30 min with 25 μ Ci/ml of Easy Tag Express 35 S and then lysed. The labeled proteins were resolved by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on November 6, 2015 by UNAM-UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Sánchez-Tacuba et al.

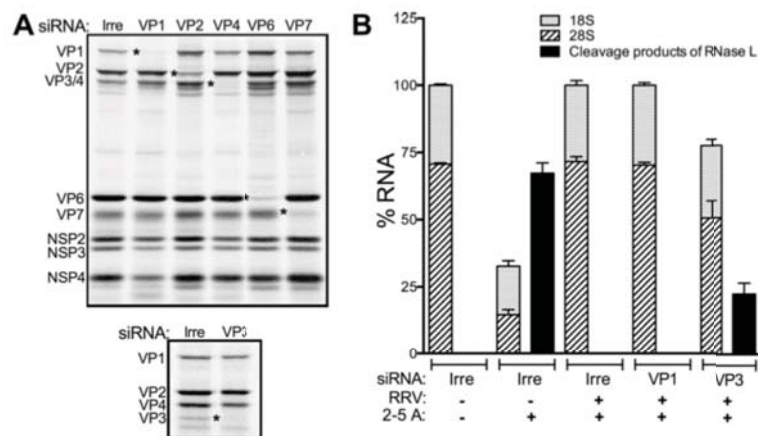


FIG 6 Rotavirus VP3 prevents the activation of RNase L triggered by dsRNA and 2-5 A. (A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs. At 72 h posttransfection, the cells were mock infected or infected with RRV at an MOI of 10. At 8.5 hpi, cells were radiolabeled for 30 min with 25 μ Ci/ml of Easy Tag Express 35 S and then lysed. The labeled proteins were resolved by 6% or 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography. Asterisks mark the positions of the knocked-down protein. (B) In parallel wells, cells transfected with the indicated siRNAs were mock infected or infected with RRV at an MOI of 10. At the same time, the cells were transfected or not with 2.5 μ M 2-5 A. At 9 hpi, the cells were lysed and total RNA was purified and analyzed on a Bioanalyzer. The cleavage products of RNase L were quantitated under each condition using the Bioanalyzer system as described in Materials and Methods. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments are shown.

RNase L, we used MAb 159, a neutralizing antibody that binds to trimers of RRV VP7 and prevents the disassembly of the viral particles but not their endocytosis (23). We found that in contrast with viral particles that were preincubated with MAb HS2, which binds to VP5 but does not neutralize viral infectivity (Fig. 5B, inset), the addition to cells of MAb 159-preincubated particles prevented rRNA degradation in the initial 3 hpi, but thereafter, an increased rRNA degradation was observed (Fig. 5B), resembling the behavior of the UV-inactivated viral particles. Taken together, these results suggest that the initial control of the degradation of rRNA is mediated by an interaction of the virus particle with a cell component that occurs during or prior to virus cell internalization.

VP3 is needed to prevent the degradation of rRNAs. As previously mentioned, it has been found that the CTD of VP3 has PDE activity and that this domain is able to replace the PDE activity of other known cellular and viral phosphodiesterases. To establish whether this activity is relevant for rotavirus replication and whether VP3 is the only viral protein involved in the control of the OAS/RNase L pathway after viral entry, we silenced the expression of each viral protein using RNAi, and the effect of the absence of each viral protein on rRNA stability was determined. Cells were transfected with siRNAs directed to each of the structural and nonstructural proteins (not shown) of the virus or with an irrelevant siRNA as a control and 72 h posttransfection were infected with RRV and transfected or not with dsRNA. The knockdown of each protein was verified by analyzing the synthesis of 35 S-labeled proteins during the infection (Fig. 6A, shown only for the structural proteins). To determine the effect of silencing the expression of each protein on the stability of rRNAs, total RNA was extracted from cells that were transfected with each siRNA, infected with RRV, and transfected or not with dsRNA and was analyzed in the Bioanalyzer as previously described. We found

that the knockdown of VP3 was the only treatment that had an effect on the degradation of rRNAs, since in the absence of this structural protein there was a clear degradation of rRNAs, while under the other conditions tested the rRNA remained intact (data not shown). Figure 6B shows the results obtained when either VP1 or VP3 was silenced and the cells were infected or not with RRV and treated with 2-5 A, where it can be seen that in the absence of VP3, but not of VP1, there was a significant degradation of rRNAs. These results directly demonstrate that VP3 plays a role in the control of RNase L during the infectious cycle of rotavirus.

The phosphodiesterase activity of VP3 is essential for viral replication. VP3 is the guanylyl-methyltransferase of the virus (24, 25). We have previously shown that when the expression of this protein is silenced by RNAi, the synthesis of viral mRNA and dsRNA decreases by about 10-fold, while the synthesis of the other viral proteins is not significantly affected (4); nevertheless, the yield of infectious progeny virus decreases by about 80%. To determine which activity of VP3, its PDE activity or its capping activity, is responsible for the decreased viral yield, we silenced the expression of VP3 and of RNase L simultaneously, with the idea of eliminating the deleterious effect of RNase L on the yield of infectious virus (Fig. 1A) and at the same time discarding the role of the PDE activity of VP3. This assay would allow us to evaluate the role of the capping activity in the replication cycle of the virus. For these assays, cells were transfected with the siRNAs directed to VP1, VP3, or RNase L either individually or in combination, and 72 h posttransfection, cells were infected with RRV. At 12 hpi, cells were harvested and the amount of infectious virus produced was determined. In these experiments, VP1 was silenced as an internal control since the absence of this protein results in a phenotype similar to that observed when VP3 is silenced, i.e., decreased viral RNA synthesis, unaltered viral protein synthesis, and decreased viral yield (4). The knockdown of VP1 and RNase L was confirmed

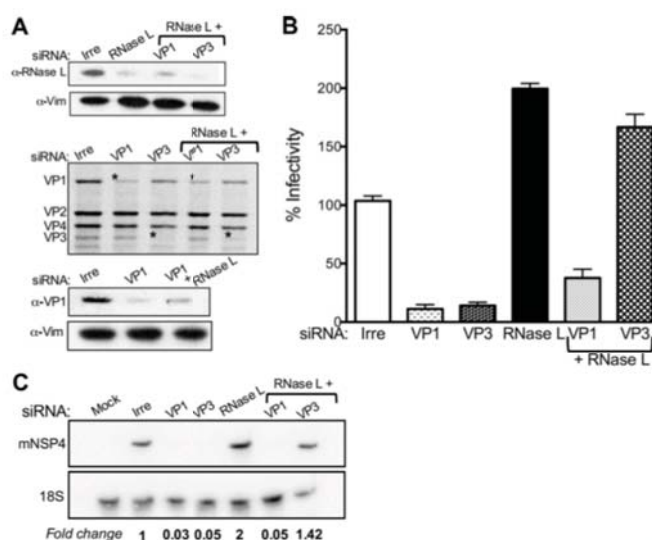


FIG 7 Viral replication in the absence of VP3 is recovered when RNase L is silenced. (A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs as described in Materials and Methods. At 72 h posttransfection, the cells were mock infected or infected with RRV at an MOI of 10. At 8.5 hpi, the cells were radiolabeled for 30 min with 25 μ Ci/ml of Easy Tag Express 35 S and then lysed. The labeled proteins were resolved by 6% or 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography, or alternatively, the proteins were detected by immunoblot analysis. The antibodies used are indicated; vimentin (Vim) was used as a loading control. Asterisks indicate the positions of the silenced protein. (B) In parallel wells, cells transfected with the indicated siRNAs were infected at an MOI of 3. At 12 hpi, cells were lysed and the virus titer was determined by an immunoperoxidase focus-forming assay. Data are expressed as the percentages of the infectivity obtained when the cells were transfected with an irrelevant siRNA (Irre), which represents 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. (C) Total RNA from MA104 cells transfected with the indicated siRNA, and infected with RRV at an MOI of 10 for 9 h, was used in a Northern blot analysis to detect the presence of gene 10 mRNA (mNSP4). 18S RNA hybridization was used as a loading control; the mRNA level of gene 10 was normalized against the level of 18S RNA. The fold change shown is relative to the value obtained from infected cells transfected with an irrelevant siRNA (set as 1). The arithmetic means from three independent experiments are shown.

by Western blotting, while that of VP3 was verified by SDS-PAGE and autoradiography of 35 S-labeled proteins, since an antibody to this protein was not available (Fig. 7A). As already observed (Fig. 1), silencing the expression of RNase L results in a 2-fold increase in virus yield, while silencing VP3 and VP1 individually decreased the production of viral progeny by about 85% (as previously shown [4]) (Fig. 7B). When VP3 was silenced at the same time as RNase L, we found that the amount of infectious virus produced under these conditions was even higher than that produced in control cells transfected with an irrelevant siRNA, while this was not the case when silencing the combination of RNase L and VP1, in which the production of infectious virus was not recovered (Fig. 7B), indicating that under conditions where the capping of rotavirus mRNAs does not occur or at least is greatly diminished, rotavirus replication is not affected.

The PDE function of VP3 protects viral RNA from RNase L degradation. To determine if preventing the activation of RNase L was important for the stability of viral transcripts, we decided to look for the integrity of viral mRNAs by a Northern blot assay. In this case, cells were transfected and infected as in the experiments shown in Fig. 7A, and at 9 hpi cells were harvested and total RNA was extracted, subjected to electrophoresis, and transferred to a Hybond membrane. The separated RNAs were hybridized with a 32 P-labeled oligonucleotide complementary to RRV gene 10 and with an oligonucleotide complementary to the 18S rRNA as a

loading control (Fig. 7C). We found that when the expression of either VP1 or VP3 was silenced during the infection, there was a significant reduction in the amount of gene 10 mRNA compared to the amount of this gene found when the cells were treated with an irrelevant siRNA. In contrast, the amount of gene 10 almost doubled when the expression of RNase L was silenced, suggesting that this RNase has a deleterious effect on viral transcripts. When VP3 was silenced in combination with RNase L, the amount of mRNA from gene 10 detected was larger than that found when cells were transfected with the irrelevant siRNA, in contrast with the case when VP1 and RNase L were silenced simultaneously, where the amount of gene 10 mRNA detected was negligible. Taken together, these results suggest that the PDE function of VP3 is very important for the stability of viral mRNAs and consequently for replication of the virus, while the capping activity of this protein does not seem to be essential for the production of progeny virus at least in one infectious cycle.

DISCUSSION

To successfully replicate, viruses have evolved a series of strategies to counteract the innate immune responses of the host cell (5, 6). Here, we have found that the OAS/RNase L pathway is activated during the replication of rotaviruses in MA104 cells, but the virus is able to control the activity of this RNase L by at least two distinct mechanisms. Early in the infection, during viral entry, there seems

to be a mechanism by which the initial interactions of the virus with the cell elicit a signal that delays the activation of RNase L. This conclusion is based on the observation that infection with TLPs or with UV-inactivated virions prevents the degradation of rRNAs in the first 3 h of infection. In contrast, this initial control is not observed when the cells are treated with DLPs or spikeless particles, since a partial degradation of rRNAs is observed in the first 3 to 6 hpi and then the RNA degradation reaches a plateau and appears to be controlled. We believe that an initial interaction of the outer surface proteins of the viral particle with a receptor on the cell surface triggers a signaling cascade that results in the inhibition or lack of activation of the RNase L that is already present, albeit nonactive, in the host cell. The elements that form part of this signaling cascade are yet to be uncovered, but it is tempting to suggest that the interactions of the viral particle with any of the molecules that have been found to play a role as rotavirus receptors (namely, sialic acid; gangliosides; integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha x\beta 2$; the heat shock cognate protein hsc70; or JAM-A) (26) could be the trigger that prevents the early activation of RNase L or the control of its activity. It has been previously found that UV-inactivated virions induce an antiviral signaling through a mechanism similar to that of live virus, and this supports the notion that type I IFN is activated when rotavirus structural components are detected rather than, or in addition to, viral replication (27–29). Our findings suggest that at the same time that the virus induces an early antiviral response of the cell, it also triggers signals that inhibit the activation of RNase L and probably other early antiviral responses of the cell.

Once the synthesis of viral proteins starts, there seems to be a second mechanism of control (between 3 and 6 hpi) of the RNase L activity; the PDE activity of VP3 degrades the 2–5 A, preventing the dimerization and activation of RNase L. TLPs, DLPs, and spikeless particles are competent in this control, while UV-inactivated particles, which prevent the initial degradation of rRNA, and the virus particles neutralized with MAb 159 to VP7, which are unable to enter the cell, no longer control the activity of RNase L, underlining the need for newly synthesized VP3.

Until recently, the main functions attributed to VP3 were its activities as a guanylyltransferase and a methyltransferase responsible for the 5' capping and the 2'-O-methylation of the 5' cap structures of the viral transcripts (24, 25), activities that are not 100% efficient, such that a portion of the viral transcripts synthesized in the cell are noncapped and could be recognized as RNA patterns that activate the immune signaling through the RIG-I signaling receptors (30, 31). The recent finding that the CTD of VP3 contains a 2'-5'-phosphodiesterase activity that degrades the activators of RNase L makes this protein a multifunctional enzyme that contributes to the virulence and the innate immune evasion mechanisms of rotaviruses.

To determine the relevance of the phosphodiesterase activity of VP3 compared with its capping function during virus replication, we silenced the expression of VP3 and RNase L simultaneously by RNAi, with the rationale that in the absence of RNase L we could evaluate the relevance of the guanylyltransferase and methyltransferase functions of this protein in the replication cycle of the virus. We have previously reported that silencing the expression of VP1 and VP3 results in a similar phenotype, in which the amount of viral transcripts and dsRNA is decreased to about 10% of the levels produced in control cells transfected with an irrelevant siRNA and the yield of viral progeny is reduced to about 15% (4). At that time,

it was difficult to explain why the absence of VP3 resulted in a decreased amount of viral RNA, since we had expected that its absence would more likely result in a lack of translation of viral mRNAs. Silencing the expression of VP3 simultaneously with that of RNase L showed that the decreased levels of viral RNA in cells where VP3 was knocked down were due not to a decreased transcription or replication of the viral genome but more likely to the activity of RNase L, whose activity could not be controlled in the absence of VP3. The results obtained from these experiments also demonstrate that uncapped viral mRNA can be encapsidated and replicated and, very interestingly, that it can produce infectious viral progeny. It is certainly necessary to directly show the absence of capped RNA in the newly synthesized virions, but the recent demonstration that the capping activity of VP3 is inefficient (31) supports this hypothesis. Interestingly, this observation could also offer an explanation for the high ratio of physical to infectious particles observed in different preparations of rotavirus, as has been recently reported for alphaviruses (32).

The present work illustrates how host cells and viruses have coevolved mechanisms to detect and prevent the activation of defense mechanisms, respectively. At the same time that the cell senses the entry of the viral particle and activates a series of antiviral measures, rotaviruses have evolved a way to prevent this early activation, until they reach the cytoplasmic compartment and begin to synthesize their proteins, some of which (VP3, NSP1, and NSP3 and maybe others) interact with host proteins and allow the virus to control directly and indirectly the innate immune responses of the cell.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to R. Silverman and B. Jha for providing us with 2–5 A, to Rafaela Espinosa and Pedro Romero for their excellent technical assistance, and to Joaquin Moreno for his help with the analysis of the results.

This work was supported by grants IG200114 from DGAPA/UNAM and 153639 from CONACyT. L.S.-T. is a recipient of a scholarship from CONACyT.

REFERENCES

- 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. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Tortorici MA, Taraporewala ZF. 2007. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv Virus Res* 69:167–201.
- Patton JT, Spencer E. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277:217–225. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0645>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02308-08>.
- Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. 2013. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 38:855–869. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.007>.
- Randall RE, Goodbourn S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89:1–47. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.83391-0>.
- Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2010. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *J Virol* 84:10457–10466. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00625-10>.
- Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. 2011. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol* 186:1618–1626. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002862>.

9. Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB. 2011. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol* 85:3717–3732. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02634-10>.
10. Montero H, Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J Virol* 82:1496–1504. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01779-07>.
11. Silverman RH. 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81:12720–12729. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01471-07>.
12. Silverman RH, Weiss SR. 2014. Viral phosphodiesterases that antagonize double-stranded RNA signaling to RNase L by degrading 2-5A. *J Interferon Cytokine Res* 34:455–463. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2014.0007>.
13. Zhang R, Jha BK, Ogden KM, Dong B, Zhao L, Elliott R, Patton JT, Silverman RH, Weiss SR. 2013. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:13114–13119. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1306917110>.
14. Mazumder R, Iyer LM, Vasudevan S, Aravind L. 2002. Detection of novel members, structure-function analysis and evolutionary classification of the 2H phosphoesterase superfamily. *Nucleic Acids Res* 30:5229–5243. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkf645>.
15. Ogden KM, Hu L, Jha BK, Sankaran B, Weiss SR, Silverman RH, Patton JT, Prasad BV. 2015. Structural basis for 2'-5'-oligoadenylate binding and enzyme activity of a viral RNase L antagonist. *J Virol* 89:6633–6645. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00701-15>.
16. Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, Lopez S. 2013. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol* 87:636–6345. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00361-13>.
17. Pando V, Isa P, Arias CF, Lopez S. 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295:190–200. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1337>.
18. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.05620-11>.
19. Padilla-Noriega L, Werner-Eckert R, Mackow ER, Gorziglia M, Larralde G, Taniguchi K, Greenberg HB. 1993. Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 31:622–628.
20. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00731-10>.
21. Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep* 3:1175–1180. <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kvf234>.
22. Silverman RH, Skehel JJ, James TC, Wreschner DH, Kerr IM. 1983. rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *J Virol* 46:1051–1055.
23. Ludert JE, Ruiz MC, Hidalgo C, Liprandi F. 2002. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol* 76:6643–6651. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.13.6643-6651.2002>.
24. Chen D, Luongo CL, Nibert ML, Patton JT. 1999. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265:120–130. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1999.0029>.
25. Spencer E, Garcia BI. 1984. Effect of S-adenosylmethionine on human rotavirus RNA synthesis. *J Virol* 52:188–197.
26. Lopez S, Arias CF. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:39–66.
27. Frias AH, Vijay-Kumar M, Gentsch JR, Crawford SE, Carvalho FA, Estes MK, Gewirtz AT. 2010. Intestinal epithelia activate anti-viral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components. *Mucosal Immunol* 3:622–632. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2010.39>.
28. Holloway G, Coulson BS. 2006. Rotavirus activates JNK and p38 signaling pathways in intestinal cells, leading to AP-1-driven transcriptional responses and enhanced virus replication. *J Virol* 80:10624–10633. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00390-06>.
29. Rollo EE, Kumar KP, Reich NC, Cohen J, Angel J, Greenberg HB, Sheth R, Anderson J, Oh B, Hempson SJ, Mackow ER, Shaw RD. 1999. The epithelial cell response to rotavirus infection. *J Immunol* 163:4442–4452.
30. Imai M, Akatani K, Ikegami N, Furuichi Y. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol* 47:125–136.
31. Uzri D, Greenberg HB. 2013. Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors. *PLoS One* 8:e69825. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069825>.
32. Sokoloski KJ, Haist KC, Morrison TE, Mukhopadhyay S, Hardy RW. 2015. Noncapped alphavirus genomic RNAs and their role during infection. *J Virol* 89:6080–6092. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00553-15>.

ANEXO II

Artículo publicado en “Biotecnología en Movimiento” Revista de divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM:

La célula propone y el virus dispone

La célula propone y el virus dispone

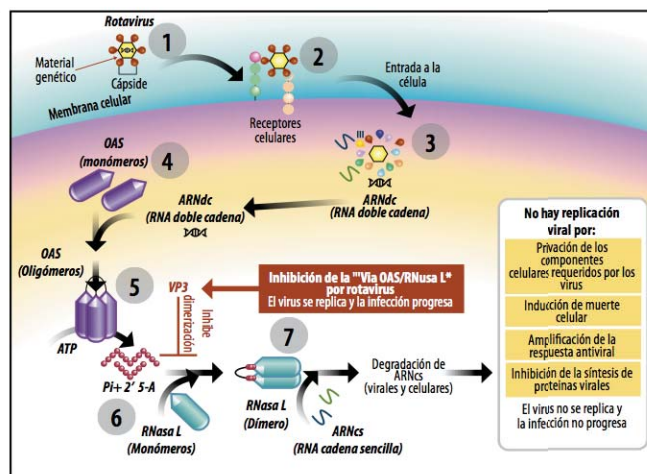
M. en C. Liliana Sánchez Tacuba y Dra. Susana López Charretón

De manera simplificada podemos definir un virus -del latín *virus*: toxina o veneno- como una entidad generalmente conformada por su material genético, que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) cubierto por una estructura protéica o cápside y que tiene capacidad de infección (1 en la figura). Los virus están en todas partes, de hecho vivimos sumergidos en un mar de virus. En todo momento los estamos inhalando, comiendo, bebiendo e incluso, algunos de nuestros genes provienen de los virus. Sin embargo, de manera interesante, pocos virus son capaces de generar infecciones con consecuencias graves, gracias al excelente trabajo de nuestro sistema inmune, a través de diferentes mecanismos como el que aquí revisaremos en detalle, que combaten la gran mayoría de las infecciones virales.

Los parásitos intracelulares obligados como los virus, sólo pueden replicarse en una célula viva, por lo que para la célula hospedera, los virus siempre parecen ser "fragmentos de malas noticias envueltos en proteínas", ya que las infecciones virales alteran las funciones vitales de la célula hospedera y, pueden incluso, causar su muerte. Por esta razón las células han implementado diversas estrategias para contender con la presencia de los virus.

Una de las formas de defensa más eficiente encontrada en los mamíferos, es la llamada "Vía antiviral OAS/RNasa L". En este mecanismo antiviral, las protagonistas centrales son dos proteínas: la 2'5'-Oligoadenilato sintetasa (OAS), una enzima que sintetiza oligoadenilatos -ya lo veremos más adelante- y la RNasa L, una enzima que tiene la capacidad de destruir el ARN, el material genético de cierto tipo de virus (juntas las llamaremos proteínas de defensa).

Veamos en detalle este elegante mecanismo de defensa celular. Una vez que un virus invasor ha logrado internarse a la célula (2 en la figura) y alcanza el citoplasma, produce -como parte de su ciclo de replicación- múltiples moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc, 3 en la figura) que servirán para la producción de nuevos vi-



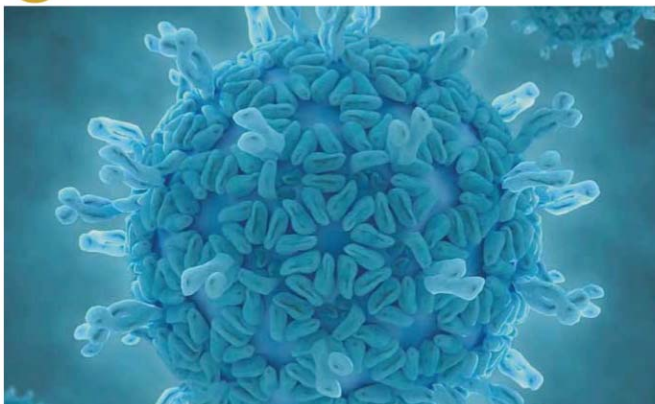
rus. Aquí participan las proteínas OAS que funcionan como centinelas celulares, ya que pueden detectar y responder de manera inmediata a la presencia de las moléculas de ARNdc producidas por los virus invasores (4 en la figura). En respuesta a los ARNdc virales, las OAS presentes originalmente en el citoplasma como moléculas individuales, forman pequeños grupos entre sí (5 en la figura) con lo que se activan, y a partir del Adenosín Trifosfato (ATP, un nucleótido esencial que es la principal fuente de energía en la célula) forman una serie de compuestos que se conocen colectivamente como 2'5'-oligoadenilatos (2'5'-A, indicado con el número 6 en la figura). En la siguiente fase de la respuesta, los 2'5'-A interactúan con las RNasa L monoméricas (RNasas L individuales) e inducen su dimerización, -esto es, se agrupan dos moléculas- (7 en la figura). El dímero de la RNasa L es la forma activa de esta proteína y tiene entonces la capacidad de cortar prácticamente cualquier ARN de cadena sencilla (actividad de ribonucleasa). De esta manera, la RNasa L puede degradar directamente el genoma viral e inhibir al mismo tiempo la síntesis de proteínas virales al destruir los ARNs, tanto mensajeros como ribosomales celulares (ver fi-



pocos virus son capaces de generar infecciones con consecuencias graves, gracias al excelente trabajo de nuestro sistema inmune



GENERANDO CONOCIMIENTO EN EL IBT



Rotavirus

algunos autores consideran a los virus como "maquinas darwinianas perfectas"

gura). El mecanismo "OAS/RNasa L" integra así, mecanismos altamente sensibles en la detección de los intrusos virales eliminando de forma eficiente las moléculas de ARN y con ello la posibilidad de ensamblar y producir más virus con capacidad de infectar más células.

Dada la versatilidad del complejo "OAS/RNasa L" para restringir las infecciones a diferentes niveles, los virus han desarrollado distintos mecanismos para evadir la respuesta celular antiviral. La búsqueda de soluciones ingeniosas por parte de los virus para tener éxito y lograr replicarse –por eso algunos autores consideran a los virus como "maquinas darwinianas perfectas"– es un tema central en nuestro grupo de investigación. Nosotras estudiamos la forma cómo un tipo particular de virus, los rotavirus, hacen frente de manera exquisita a la maquinaria antiviral que aquí hemos descrito. Los rotavirus son el principal agente causante de las gastroenteritis agudas, responsables de más de medio millón de muertes al año de infantes menores de dos años en el mundo. Uno de nuestros principales intereses, es entender por qué las infecciones causadas por rotavirus son tan exitosas, a pesar de que las células cuentan con un arsenal increíble de armas antivirales para frenar la infección. El resultado puede ser la conquista de la célula huésped, que es utilizada para producir nuevas partículas virales capaces de infectar otras células. En nuestro laboratorio estudiamos el papel de la "Vía OAS/RNasa L" en la infección por rotavirus. Primero, evaluamos la eficiencia en la producción de nuevas partículas virales en células en cultivo (MA104 de riñón de mono), en donde las cantidades de las proteínas de defensa: OAS y RNasa L (4-7 en la figura) se disminuyeron artificialmente. En estas condiciones, encontramos que la producción de virus es más eficiente, en comparación con las células que tienen los niveles nor-

males de la OAS y la RNasa L. Estos resultados indican que esta vía tiene un papel importante en el combate de los rotavirus. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con otros virus, en las células infectadas con rotavirus, la RNasa L (la enzima a cargo de destruir los ARNs) ¡No se activa!

Por supuesto, nuestra siguiente misión, fue descubrir los trucos moleculares mediante los cuales estos virus en particular, son capaces de modificar a su favor la respuesta celular antiviral. En el laboratorio empleamos una técnica (llamada ARN de interferencia) con el fin de eliminar o disminuir la producción de las proteínas que forman el rotavirus, una por una, para así desenmascarar a la responsable del mecanismo de evasión. De esta manera, encontramos que la proteína viral, conocida como VP3 es en parte responsable. ¿Qué hace VP3? Entre las actividades de la proteína VP3 de los rotavirus, destaca la de 2-fosfodiesterasa (2-FDE), una proteína –llamada enzima– capaz de hidrolizar o romper los enlaces 2-fosfodiéster, que es el enlace que mantiene unidos a los nucleótidos de adenina que conforman a los oligoadenilatos (2'5-A). Al eliminarse los 2'5-A, las moléculas no pueden formar pares y con ello se evita la activación de la RNasa L. En este escenario no hay manera de que los ARNs virales o celulares se degraden y, en consecuencia, la producción de rotavirus adicionales puede seguir su curso y por lo tanto la enfermedad se presenta.

Además de este mecanismo, hemos encontrado que los rotavirus poseen al menos un mecanismo extra para contender con la "Vía OAS/RNasa L", el cual aún no hemos elucidado por completo, aunque sabemos que se activa en las fases iniciales del contacto de los rotavirus con su célula huésped, fase en la que otra proteína viral, la VP4, también está involucrada.

El entender cómo los rotavirus son capaces de evadir el efecto de los mecanismos celulares altamente eficientes en la eliminación de los virus, provee información invaluable para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, que en un futuro nos permitirán "curar" o disminuir la severidad de la infección causada por rotavirus.

Esta investigación fue publicada originalmente en:
Liliana Sánchez-Tacuba, Margarito Rojas, Carlos F. Arias, and Susana López. 2015. Rotavirus controls activation of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L pathway using at least two distinct mechanisms. *Journal of Virology*, vol. 89, págs. 12145-12153.

Contacto: susana@ibt.unam.mx

ANEXO III

Artículo publicado en “*Annual Review of Virology*”:

Rotavirus Strategies Against the Innate Antiviral System


**ANNUAL
REVIEWS Further**

Click here to view this article's online features:

- Download figures as PPT slides
- Navigate linked references
- Download citations
- Explore related articles
- Search keywords

Rotavirus Strategies Against the Innate Antiviral System

Susana López, Liliana Sánchez-Tacuba,
Joaquin Moreno, and Carlos F. Arias

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México; email: susana@ibt.unam.mx

Annu. Rev. Virol. 2016.3:591-609. Downloaded from www.annualreviews.org. Access provided by Universidad Nacional Autónoma de México on 11/21/16. For personal use only.

Annu. Rev. Virol. 2016. 3:591–609

First published online as a Review in Advance on July 29, 2016

The *Annual Review of Virology* is online at virology.annualreviews.org

This article's doi:
10.1146/annurev-virology-110615-042152

Copyright © 2016 by Annual Reviews.
All rights reserved

Keywords

innate immune response, host range restriction, type I IFN, type III IFN, *Reoviridae*, dsRNA

Abstract

“Rotaviruses represent the most important etiological agents of acute, severe gastroenteritis in the young of many animal species, including humans.” This statement, variations of which are a common beginning in articles about rotaviruses, reflects the fact that these viruses have evolved efficient strategies for evading the innate immune response of the host and for successfully replicating in the population. In this review, we summarize what is known about the defense mechanisms that host cells employ to prevent rotavirus invasion and the countermeasures that these viruses have successfully developed to surpass cellular defenses. Rotaviruses use at least two viral multifunctional proteins to directly interact with, and prevent the activation of, the interferon system, and they use at least one other protein to halt the protein synthesis machinery and prevent the expression of most of the transcriptional antiviral program of the cell. Characterization of the confrontation between rotaviruses and their host cells has allowed us to learn about the virus–host coevolution that prevents the damaging effects of the innate immune response.

TLR: Toll-like receptor

RLR: RIG1-like receptor

IRF: interferon regulatory factor

IFN: interferon

INTRODUCTION

Rotaviruses are one of the most important causes of acute, severe gastroenteritis in children under 5 years of age. They are responsible for approximately 200,000 deaths each year, particularly in developing countries (1–3), despite the recent introduction of two safe and effective vaccines (4). Rotaviruses have also been isolated from a wealth of avian and mammalian species and represent an important veterinary problem in terms of health and economic impact (5).

Rotaviruses have a specific cell tropism, infecting primarily the mature epithelial cells of the small intestine. They also show marked host range restriction; most viral strains isolated from one animal species tend to have diminished virulence and replication capacity in heterologous species. The basis of this host range restriction is probably multifactorial (6–14). The viral spike protein VP4, which interacts with cell receptors during cell entry (15–18), has been identified as a major determinant of the cell and host tropism of the virus, although its precise function in host restriction is still undefined (7, 11–13). NSP1, a nonstructural viral protein, has also been identified as an independent factor that influences host range restriction. Of interest, host range restriction has been used as the basis for the development of rotavirus vaccines. Of the two licensed vaccines, RotaTeq (Merck) is based on genetic reassortants in which a naturally attenuated bovine virus strain is used as the genetic backbone for rotavirus genes encoding the surface proteins (VP7 and VP4) of the most common human serotypes (19).

Rotaviruses, members of the *Reoviridae* family, are nonenveloped viruses formed by three concentric layers of protein that surround a genome composed of 11 segments of dsRNA, which encode six structural (VP1–6) and six nonstructural (NSP1–6) proteins (5). The replication cycle of these viruses is summarized in **Figure 1**.

A well-established model for studying rotavirus infection is the mouse model. It mimics several aspects of rotavirus infection in humans: Suckling mice are susceptible to rotavirus infection and develop diarrhea, but in adult mice rotavirus infection does not cause disease, although the virus replicates in intestinal epithelial cells (IECs). In this model, as well as in cultured epithelial cells, it has been found that part of the restriction in the ability of rotaviruses to replicate efficiently is mediated by the innate immune response. Accordingly, the characterization of rotavirus strains grown in homologous and heterologous animal models and in cultured cells has allowed the identification of several defense mechanisms that the virus uses to evade the antiviral host response.

INNATE IMMUNE RESPONSE, INTERFERONS, AND VIRAL INFECTIONS

As a first line for detecting and preventing the invasion of viral pathogens, host cells have developed a series of membrane-bound and cytosolic receptors that sense various molecules of the invading pathogen. Viral nucleic acids are recognized by the membrane-anchored Toll-like receptors (TLRs), the RIG1-like receptors (RLRs), the dsRNA-dependent protein kinase PKR (20, 21), and the viral DNA sensors (22). Ligand-activated sensors mediate the assembly of signaling complexes that promote the activation of the antiviral program. The TLRs use MyD88 and TRIF as adaptors (23); the RLRs (RIG1 and MDA5) signal through MAVS (24–26); and the DNA sensors depend on STING (27). These signaling cascades trigger the activation of protein kinases, which subsequently phosphorylate transcription factors, including the interferon regulatory factors (IRFs) and NFκB (28), which in turn translocate to the cell nucleus and upregulate the expression of proinflammatory molecules, chemokines, cytokines, and interferons (IFNs) to activate antiviral responses and alert neighboring cells (**Figure 2**) (29, 30).

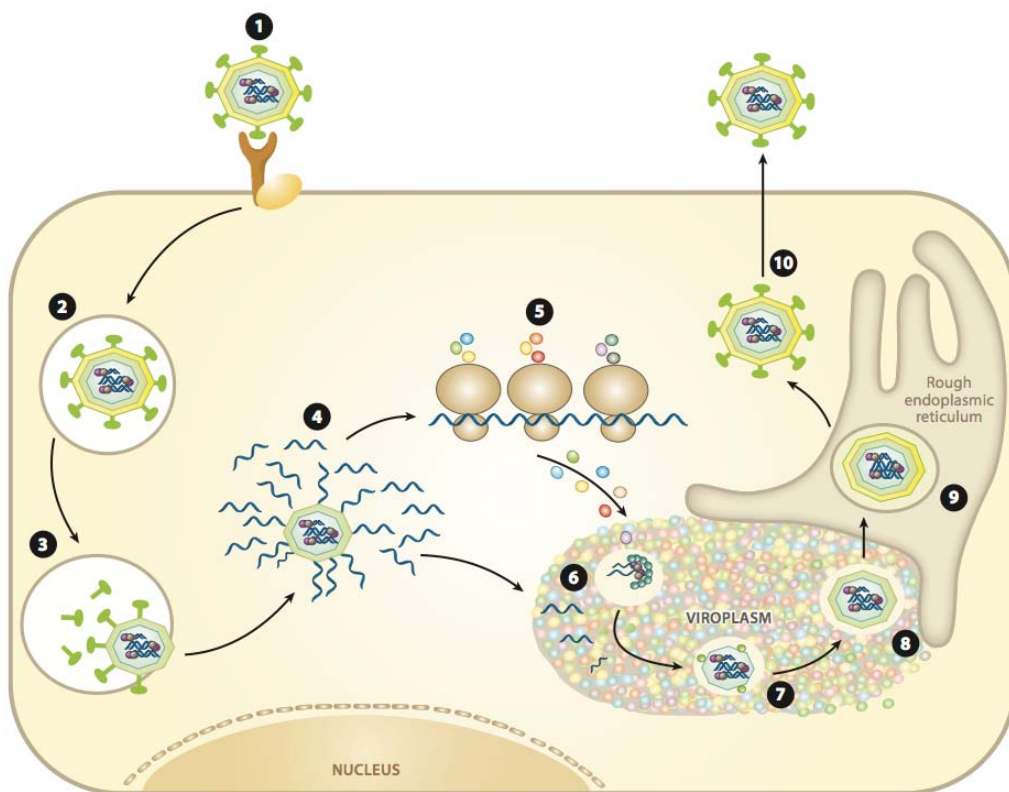


Figure 1

Rotavirus replicative cycle. The viral replication cycle starts with (1) the binding of the virion to the cell surface and (2) its internalization by endocytosis. Inside the cell, (3) the outer protein layer is shed and (4) the double-layered particle becomes transcriptionally active, giving rise to 11 RNA transcripts that encode 12 viral proteins. (5) Once a critical mass of viral protein is accumulated, the mRNA transcripts also serve as templates for the synthesis of the genomic dsRNA, which occurs in replication intermediate particles within electron-dense structures called viroplasm that are composed of viral proteins, viral RNA, and some cellular proteins. (6–8) Newly synthesized single- and double-layered particles assemble concurrently with genome replication, and (9) the double-layered particles then bud through an NSP4- and VP7-modified endoplasmic reticulum membrane into the lumen of the rough endoplasmic reticulum, where the final maturation of the viral particle takes place. (10) Triple-layered infectious particles exit the cell either by lysis or through a nonlytic process, depending on the cell line.

There are three distinct types of IFNs: I, II, and III. Although type II IFNs have been associated mainly with resistance against different types of intracellular microorganisms, type I and III IFNs seem to be primarily committed to antiviral protection (28). Type I IFNs are key components of the host defense against viruses (28), and type III IFNs also represent an important innate immune barrier against viral infections (31, 32). In humans, type I IFNs are encoded by 13 genes for IFN α and one each for IFN β , IFN ϵ , IFN κ , and IFN ω (although the roles for the last three have been less well characterized) (33); the type III IFNs are encoded by four genes for IFN λ 1–4 (34). Type I IFNs (IFN α and IFN β) and type III IFNs (IFN λ) produced in infected cells are secreted and act in

Annu. Rev. Virol. 2016.3:591-609. Downloaded from www.annualreviews.org. Access provided by Universidad Nacional Autonoma de Mexico on 11/21/16. For personal use only.

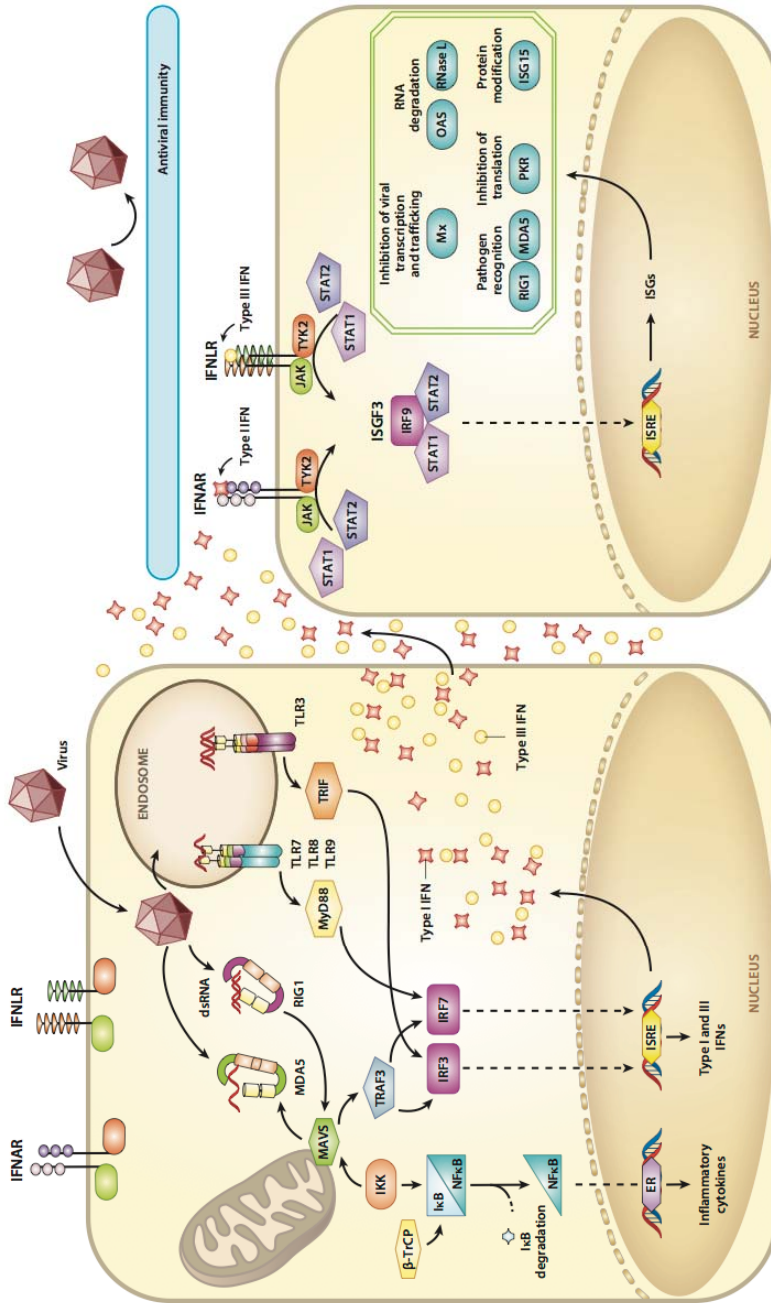


Figure 2

IFN response. Viral infections elicit a variety of cellular responses that are initiated by signals from virus-sensing receptors (RLRs or TLRs) present in the host cell. Ligand-activated sensors mediate the assembly of signaling complexes that promote the activation of the antiviral program. The TLRs use MyD88 and TRIF as adaptors; the RLRs RIG1 and MDA5 signal through MAVS, located in the outer mitochondrial membrane. These signaling cascades trigger the activation of host transcription factors, including IRF3, IRF7, and NF κ B, and their translocation to the nucleus. Type I and III IFNs, proinflammatory molecules, and cytokines are expressed and secreted from infected cells and act on neighboring cells. Type I and III IFNs are recognized by IFNARs and IFNLRs present on the surface of the cells, and the JAK/STAT pathway is then activated. The phosphorylated forms of STAT1 and STAT2 associate with IRP9 to form the heterotrimeric complex ISGF3, which translocates to the nucleus, leading to the downstream transcription and expression of ISGs, whose products inhibit viral infection and alter other cellular functions. Abbreviations: IFN, interferon; IFNAR, type I IFN receptor; IFNLR, type III IFN receptor; IRF, interferon regulatory factor; ISG, interferon-stimulated gene; ISRE, interferon-stimulated response element; OAS, 2',5'-oligoadenylate synthetase; RLR, RIG1-like receptor; TLR, Toll-like receptor.

both an autocrine and a paracrine manner through their interaction with their membrane-bound receptors to signal the activation and transcription of IFN-stimulated genes (ISGs) that promote the antiviral response.

Type I and III IFNs bind to unrelated heterodimeric receptors. The receptor for type I IFNs (IFNAR) is formed by the subunits IFNAR1 and IFNAR2, which are ubiquitously expressed (35), whereas type III IFNs bind to a receptor (IFNLR) formed by the specific IFN λ receptor chain 1 and the shared IL-10 receptor chain 2 (32, 36). Although type I and III IFNs and their receptors are distantly related, they show almost identical signaling pathways. After engaging with their ligands, both receptors induce the same JAK/STAT pathway (32, 37, 38). The phosphorylation and activation of JAK1 and TYK2 kinases, which are associated with the IFN receptors, lead to the phosphorylation of the transcription factors STAT1 and STAT2. The phosphorylated forms of STAT1 and STAT2 associate with IRF9 to form a heterotrimeric transcription complex, called ISGF3, that translocates to the nucleus to induce the expression of more than 300 ISGs, whose encoded protein products act in concert to restrict viral replication (Figure 2) (28, 39).

Even though both type I and type III IFNs are induced by and protect from viral infections, their receptors are differentially expressed among different tissues, which results in their different roles *in vivo*. In general, most cell types are thought to respond to type I IFNs, whereas type III IFN responses are largely confined to epithelial cells (40–42).

ISG:
interferon-stimulated
gene

MEF: mouse embryo
fibroblast

ROTAVIRUS INFECTION TRIGGERS THE INNATE IMMUNE RESPONSE

Role of RIG1-Like Receptors and MAVS

Much of our current understanding of the host response to rotavirus infection has come from *in vivo* studies in suckling and adult mice using homologous (murine) and heterologous (human, simian, porcine, or bovine) rotavirus strains, from *in vitro* studies using human (Caco2, HT29) and simian (MA104, Cos7) cell lines that are permissive to rotavirus replication, and from studies using wild-type or knockout mouse embryo fibroblasts (MEFs).

Both RIG1 and MDA5 have been implicated in the detection of rotavirus in infected intestinal cells in mice and in MEFs. Early during infection, rotaviruses activate RIG1 and MDA5, alone or in combination, in a replication-dependent manner. The absence of either of these two factors decreases, but does not abolish, the magnitude of IFN β activation, which is mediated through MAVS, their common adaptor protein (43–45). Rotavirus-infected adult mice lacking MAVS produced less IFN β and shed increasing amounts of virus compared with wild-type mice (43). Similar findings have recently been reported in rotavirus-infected mouse MAVS^{-/-} macrophages in which the production of IFN and antiviral cytokines had been abolished (46), underscoring the importance of this adaptor protein. Additionally, neither JNK and p38 kinases nor the NLRP3 inflammasome was triggered in rotavirus-infected macrophages, suggesting that these components might not have an important role in the innate immune response to rotavirus in these cells (46).

The characteristics of the RNA molecules present in a viral infection determine which RLR is activated. In general, RIG1 is activated by uncapped 5'-triphosphorylated RNAs or by monophosphates at the 5' or 3' ends of RNA (20, 47), whereas MDA5 preferentially recognizes dsRNAs or highly structured RNA molecules (20, 48). The length of the RNA molecules also determines RLR recognition: Short RNA molecules are preferentially recognized by RIG1, but longer fragments (more than 2 kb) are sensed by MDA5 (49). It is not clear how rotavirus dsRNA is detected by RIG1 and MDA5 in the cytoplasm of infected cells because replication of the viral genome

takes place in intermediate viral particles within viroplasm (50), hidden from host sensors. Nevertheless, the activation of RLRs early during infection suggests that it is likely that nascent viral transcripts are readily detected by RIG1 and MDA5. The size range of the viral transcripts, the recent observation that the capping activity of VP3 during mRNA synthesis is not very efficient (51, 52), and the detection of highly structured viral mRNA in the cytoplasm of infected cells (53, 54) strongly suggest that viral RNA molecules, probably different from genomic dsRNA, could elicit the activation of RIG1 and MDA5 and could also be detected by TLRs.

Role of Toll-Like Receptors and Their Adaptors TRIF and MyD88

In addition to RLRs, membrane-anchored TLRs have been implicated in the detection of viral RNA and activation of the innate immune response to rotavirus infection. However, contradictory data and results have been reported by several groups, most likely due to the use of different rotavirus strains, cell types, or biological systems to characterize the effect of these molecules on rotavirus replication, which emphasizes the need for unifying assays to achieve more definitive conclusions.

There is an important age-dependent susceptibility to symptomatic rotavirus infection in humans as well as in animals; however, the mechanisms involved in this differential susceptibility have not been completely elucidated. A marked reduction of virus shedding (approximately 100-fold) has been observed after infection in adult mice compared with infection in suckling mice (55, 56). The age-dependent expression of TLR3 might be one of the explanations for age-dependent susceptibility. TLR3 is an endosomal TLR that recognizes dsRNA and signals through TRIF to activate NF κ B. The production of type III IFNs mediated by TLR3 could contribute to limiting rotavirus replication in adult mice, and the absence of TLR3 in the intestinal epithelium of suckling mice could favor rotavirus replication (57). However, although diarrhea is not induced in adult mice, rotaviruses can replicate in their intestines, suggesting that TLR3 signaling is not enough to prevent infection and that other innate immune responses might be important in preventing the disease. Indeed, TLR3^{-/-} or TRIF^{-/-} adult mice orally infected with rotavirus were found to show neither increased IFN β production nor augmented rotavirus replication, supporting the observation that TLR3 might not play an essential role in defending against rotavirus infection (43). These conflicting results most likely stem from the different rotavirus strains characterized, because homologous and heterologous strains were studied in these two reports (43, 57).

Other TLRs have also been implicated in stimulating the innate response to rotavirus infection. In human plasmacytoid dendritic cells, TLR7, TLR9, or both play a role in rotavirus recognition. Even though these cells are poorly permissive to rotavirus infection, they are an important source of IFN and represent an important link between the adaptive and innate immune systems (58). More recently, the role of MyD88 signaling during rotavirus infection was studied (MyD88 mediates signaling for all TLRs except TLR3, as well as for the receptors of cytokines IL-1 and IL-18), and it was found that MyD88-mediated TLR signaling protects against acute rotavirus infection in suckling and adult mice, suggesting that TLRs (TLR7, TLR8, and TLR9) that recognize nucleic acids and induce antiviral cytokines could be targets for controlling and preventing rotavirus disease. This MyD88-mediated protection suggests a role for TLRs in the initial control of rotavirus infection, although the mechanism of this signaling and the TLR involved have not been identified (59).

SUSCEPTIBILITY OF ROTAVIRUS REPLICATION TO INTERFERONS

To be able to successfully replicate, rotavirus has coevolved with its host. It has been shown in experimental models that less than 10 infectious units of a homologous rotavirus are able to

establish a robust infection in suckling mice with an intact IFN response system (8), suggesting that these viruses have developed efficient strategies for evading recognition by the innate immune response of the host and subverting IFN-mediated responses in rotavirus-infected or bystander IECs (60–62).

Type I Interferons

The role of type I IFNs in rotavirus infection has been extensively studied and discussed. It has been shown that elevated serum levels of type I IFNs can be detected in children and in newborn calves infected with rotavirus (63, 64). In vitro infection of HT-29 cells with simian rotavirus induces the secretion of type I IFNs (65), and dendritic cells that have been weakly infected by a rotavirus also produce type I IFNs in response to rotavirus exposure (58). A single-cell approach revealed that IFN expression is suppressed in the IECs of mice infected with murine rotavirus and that most of the intestinal type I IFNs were produced in hematopoietic cells (62). Several lines of evidence have suggested that the replication of homologous rotavirus strains are only moderately sensitive to type I IFNs, although the replication of heterologous strains is clearly affected: (a) The replication of murine rotavirus strains in suckling mice is very efficient, but the replication of heterologous strains (e.g., human, bovine, simian) is poor (8); (b) a murine rotavirus strain replicates to high titers in suckling mice, and its replication is only modestly enhanced in the absence of type I and II IFNs or STAT (62, 66); (c) mutant infant or adult mice lacking the receptor for type I IFNs (IFNAR) did not show an increased susceptibility to murine rotavirus infection (67, 68); (d) oral or intraperitoneal administration of type I IFNs did not delay or decrease diarrheal disease in mice infected with murine rotavirus (67); (e) the replication of heterologous rotavirus strains is restricted in MEFs, and this restriction is reduced in IFN-deficient MEFs lacking IFNAR or STAT1 (69); and (f) in cultured human IECs (Caco2 and HT-29), 3-day pretreatment with type I IFNs caused only a small reduction (~10 times) in the infectivity of human and simian strains (70). Altogether, these observations suggest that the host range restriction might be defined, at least in part, by the innate immune response of the host and the ability of rotaviruses to counteract this cellular system (see below) (60, 61, 66).

Type III Interferons

In contrast with type I IFNs, the role of the recently described type III IFNs (34, 71) in rotavirus infection has only begun to be elucidated. Unlike IFNAR, which is present on virtually all cell types, the type III IFN receptors (IFNLR) are primarily expressed on the surface of cells of epithelial origin. Consequently, the effects of type III IFNs are more evident in organs such as the intestine, lungs, and skin, contributing to the specialized immune mechanisms of epithelial surfaces that are constantly exposed to commensal and pathogenic microbes (72). The cells responsible for the production of type III IFNs are still poorly characterized, but they seem to overlap partially with type I IFN-producing cells (34, 72, 73). Therefore, the tissue distribution of type III IFNs and their receptors suggests that they might have a role in controlling rotavirus infection.

In vivo, type I and type III IFN functions are not fully redundant, as their respective contribution to the antiviral defense depends strongly on the particular virus. Apparently, type III IFNs seem to be more potent than type I IFNs in controlling rotavirus infection. In IECs from suckling mice, rotavirus infection was found to induce the expression of type I and type III IFN mRNAs, and type I IFN treatment of mice pups slightly reduced viral replication, although type III IFN treatment had a more pronounced effect on viral replication (68). Accordingly, mice lacking IFNLR, and to a lesser degree mice lacking IFNAR, had higher levels of viral replication as compared with

ISRE:
IFN-stimulated
response element

wild-type mice, demonstrating the importance of the IFN system in modulating viral replication (68). Type III IFN production by IECs was not enough to limit rotavirus replication; for effective control of rotavirus replication the concerted action of IL-22 (produced by group 3 innate lymphoid cells) and type III IFNs was necessary. Following rotavirus infection, IECs produced and released alarmin IL-1 α , which in turn enhanced the production of IL-22 by group 3 innate lymphoid cells, and type III IFNs and IL-22 were proposed to synergistically activate STAT1 for optimal transcription of ISGs to limit rotavirus replication (74). In addition, treating mice with bacterial flagellin was found to prevent rotavirus infection and cure chronically infected mice. Interestingly, the ability of flagellin to prevent or clear rotavirus infection was recapitulated by the administration of IL-22 and IL-18 to mice, leading to a reduction in viral load in an effect that was independent of type I and type III IFNs (75). Thus, it seems that the antiviral response of the host cell is more complicated than previously thought, and the participation of IFNs and cytokines produced by IECs, immune cells, or both is necessary to control rotavirus replication and spreading.

More information is needed to clarify the relative effects of type I and type III IFNs on the replication of rotaviruses; however, the signaling pathways that are responsible for their induction (IRFs, NF κ B) are common, and type I and III IFNs also share activation and signaling through the JAK/STAT pathway, which triggers the expression of ISGs and secondary IFN subtypes. Interestingly, several studies have shown that rotaviruses have developed mechanisms to interfere with these common transcription activators to suppress their function (see below). Thus, irrespective of the IFN type, rotaviruses have evolved strategies to counteract the cellular innate response to successfully replicate in their hosts (60, 61, 76, 77).

VIRAL MEASURES TO COUNTERACT HOST CELL RESPONSES

Rotavirus NSP1, a Multi-Interactor Protein

Activation signals from TLRs and RLRs induce the phosphorylation of the IRF-association domain present in most IRFs and/or the dimerization of the IRFs, leading to their translocation to the nucleus and binding to IFN-stimulated response elements (ISREs) present in the promoters of IFNs and ISGs (Figure 2). Like many other viruses (28), rotaviruses have evolved multiple mechanisms to counteract the innate immune response of the host, one of which is to produce proteins capable of antagonizing the IFN response. The best characterized of these proteins is NSP1, an ~57-kDa protein encoded by rotavirus gene segment 5, which is the least conserved among rotavirus proteins and shows extreme sequence diversity (78). NSP1 has a conserved N-terminal RING domain and a variable C-terminal domain that allows the direct interaction of this protein with several host proteins to induce their proteasome-mediated degradation (reviewed in 77), features that suggest NSP1 might function as an E3 ubiquitin ligase (79, 80), although direct evidence demonstrating this activity is lacking.

The first suggestion that NSP1 was involved in modulating the IFN pathway came from a yeast two-hybrid assay in which the interaction between IRF3 and NSP1 was detected (81). Later, this interaction was validated, and it was subsequently shown that, depending on the viral strain and the host species, NSP1 can send to proteasome-mediated degradation several IRFs in addition to IRF3, such as IRF5, IRF7, and IRF9, but not IRF1 (82–84). It has also been shown that the IRF-associated domain of these IRFs, which mediates homodimer and heterodimer formation (85), is the region that interacts with the C terminus of NSP1, which leads to its subsequent proteasome-mediated degradation (Figure 3a); this mechanism is conserved among many animal rotavirus strains (82).

In contrast to most NSP1 proteins from animal rotavirus strains, the NSP1 of most human and porcine rotaviruses blocks the expression of IFN by inducing the proteasomal degradation of

Annu. Rev. Virol. 2016.3:591-609. Downloaded from www.annualreviews.org. Access provided by Universidad Nacional Autonoma de Mexico on 11/21/16. For personal use only.

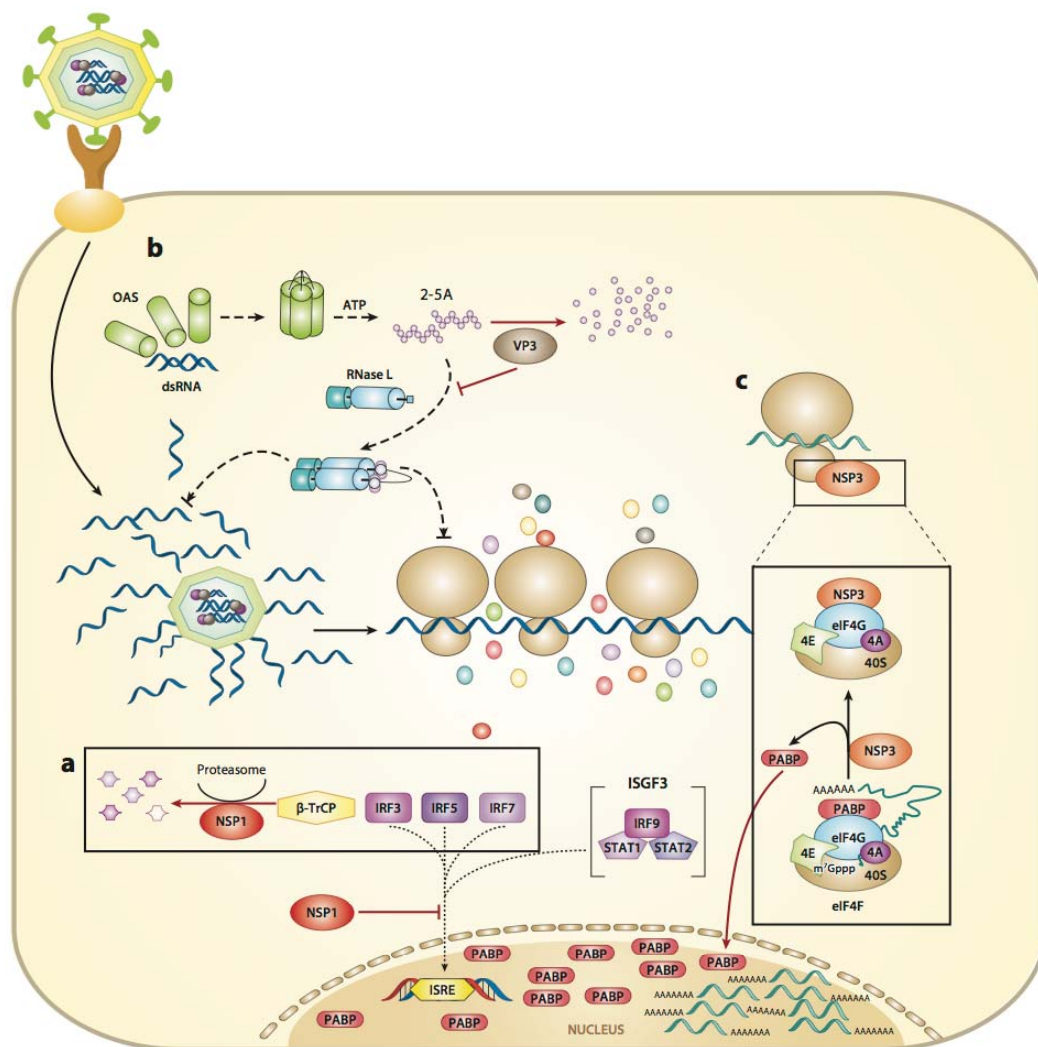


Figure 3

Rotavirus measures to counteract the host response. (a) During infection, NSP1 interacts with, and causes the proteasome-dependent degradation of, IRF3, IRF5, IRF7, and β-TrCP, and also prevents the activation and translocation of ISGF3 in a proteasome-independent manner. (b) In the presence of dsRNA, OAS oligomerizes and synthesizes 2',5'-oligoadenylates (2-5As), which in turn interact with RNase L, causing its dimerization and activation. The phosphodiesterase activity of VP3 degrades the 2-5As, preventing RNase L activation. (c) NSP3 interacts specifically with eIF4G, displacing PABP and preventing the translation of poly(A)-containing mRNAs. Also during infection, PABP and poly(A)-containing mRNAs accumulate in the cell nucleus. Abbreviations: 2-5A, 2'-5'-oligoadenylate; IRF, interferon regulatory factor; ISRE, interferon-stimulated response element; OAS, 2',5'-oligoadenylate synthetase.

β -TrCP, a cellular E3 ligase that is essential for NF κ B activation (80, 86). In uninfected cells, NF κ B is retained in the cell cytoplasm through its interaction with I κ B (87). Signaling from TLRs, RLRs, and other receptors activates the I κ B kinase that phosphorylates I κ B in the two serine residues present in a six-residue region known as a phosphodegron motif (88). This motif is recognized by β -TrCP, leading to the ubiquitination and degradation of I κ B, thus releasing NF κ B, which translocates to the nucleus and activates the transcription of IFNs and ISGs (89). Interestingly, the C-terminal domains of some human and porcine NSP1 proteins have a degron-like motif that upon phosphorylation by kinases in rotavirus-infected cells mimics a phosphodegron that recruits β -TrCP and induces its proteasomal degradation, thus preventing the activation of NF κ B (80). Notably, this seems to be a strategy shared by viruses belonging to different families (90–94), underscoring the importance of the NF κ B pathway in pathogen surveillance and signaling and the need for different viruses to inhibit its activation. β -TrCP also mediates the degradation of other proteins involved in the activation of NF κ B, such as IFNAR (95) and IRAK1 (96). Thus, it is expected that the NSP1 proteins that direct the degradation of β -TrCP will also impact the half-lives of these other proteins.

In addition to the well-characterized proteasomal degradation of IRFs and β -TrCP, other studies have found that NSP1 has also evolved several strain-specific strategies to target and induce the proteasome-mediated degradation of other immunomodulatory factors. For example, some rotavirus NSP1 proteins interact with and mediate the degradation of TRAF2 (97), a member of the TRAF family that is involved in mediating signaling from several cellular receptors, among which are those that activate the NF κ B pathway (98). Additionally, it has also been shown that some NSP1 proteins can induce the degradation of p53, a cellular factor that promotes apoptosis in stressed cells (99).

Furthermore, it has been found that the NSP1 protein of some animal rotaviruses can block the transcriptional activity of IRF3 without inducing its degradation (100) or prevent the signaling of RIG1 (101) and MAVS (102) in a proteasome-independent manner. This suggests that this viral nonstructural protein has several mechanisms for preventing the activation of IFNs and ISGs in the host cell (reviewed in 60, 77) and also for preventing the signaling of IFNs in neighbor cells (see below). Unraveling the antiviral functions of NSP1 is a work in progress, and it is relevant to determine how many more host interactors of NSP1 exist and the consequences of these interactions in preventing the antiviral responses of the cell.

Blocking the Activation of STATs

Any type of IFN (I, II, or III) secreted from infected cells binds to its receptors, which may be present in infected cells, bystander cells, or both, and activates a signaling cascade that results in the expression of hundreds of ISGs. As previously mentioned, once IFNs interact with their receptors, the JAK/STAT pathway becomes activated; phosphorylated STAT1 and STAT2 form a heterodimer that associates with IRF9, forming the ISGF3 complex that is then translocated to the nucleus, where it upregulates ISG expression (Figure 2) (103). The activation of this complex is central to the IFN transduction signaling pathway; thus, several viruses have developed different strategies to prevent its activation (28). Rotaviruses are not the exception; it has been observed that during rotavirus infection, the nuclear translocation of STAT1 and STAT2 is blocked, thus preventing its transcriptional activity (104). In addition, the ability to prevent STAT nuclear translocation was found to be conserved in several rotavirus strains, and this is independent of the interaction of this complex with IMP α 5, which is necessary for its nuclear translocation (105). The degradation of IRFs mediated by NSP1, including IRF9, was not found to be relevant for this phenotype (105). Additionally, a recent report has shown that at a late stage of infection,

rotaviruses are able to prevent the phosphorylation, and thus the activation, of STAT1 in infected and bystander cells. Furthermore, the heterologous expression of NSP1 alone could prevent the phosphorylation of STAT1, but interestingly, this effect was independent of the proteasome. In this study, however, the nuclear localization of STATs was not analyzed (106). Whether the inhibition of STAT transcriptional activity depends on NSP1 is still controversial; differences reported could be due to different experimental approaches being used (single-cell analysis versus whole-cell culture), the time frame analyzed, and the cell lines employed. Nevertheless, these studies support the fact that during rotavirus infection, the activation of STATs is hampered and the transcriptional activation of ISGs is prevented (**Figure 3a**). The mechanism by which this inhibition occurs involves blocking the phosphorylation of STAT1 and inhibiting STAT1 and STAT2 translocation into the nucleus. Whether these two processes are needed or depend on each other, the mechanism by which STAT1 and STAT2 are retained in the cytoplasm, and the role that NSP1 or other viral proteins might play in this viral countermeasure remain to be determined.

OAS:
2',5'-oligoadenylate
synthetase

VP3, a Multifunctional Enzyme

VP3 is an ~98-kDa structural protein encoded by rotavirus RNA segment 3. This is an ssRNA-binding protein present in 12 copies in the nucleocapsid of the viral particles, where it associates with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase of the virus (107, 108). Until recently, the main functions attributed to VP3 were its activities as the guanylyltransferase and methyltransferase responsible for the 5'-capping and 2'-O-methylation of the 5'-cap structures of the viral transcripts (109, 110). Apparently, these activities are not very efficient, because a fraction of the synthesized viral transcripts are noncapped and could therefore be recognized as RNA patterns to activate the immune signaling pathway through RLR or TLR sensors (52, 111). The presence of cytoplasmic dsRNA also triggers the activation of the 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS)/RNase L pathway, which catalyzes the degradation of cellular and viral RNAs, contributing to (among other things) a general shutoff of protein synthesis. The presence of dsRNA induces the oligomerization of the OAS that is present in small amounts in the cytoplasm, thus activating it. Once active, OAS synthesizes 2',5'-oligoadenylates (2-5As) using ATP as a substrate; these 2-5A molecules bind with high specificity and affinity to monomers of RNase L, inducing its dimerization and its activation (**Figure 3b**) (112). Activated RNase L degrades viral and cellular RNAs, inducing cellular autophagy and apoptosis and inhibiting viral replication (112–114).

The C-terminal domain of VP3 from a simian rotavirus strain contains a 2',5'-phosphodiesterase motif similar to that of the ns2 protein of the mouse hepatitis virus, which has been shown to antagonize the antiviral activity of RNase L by degrading 2-5As (114, 115). The C-terminal domain of rotavirus VP3 has a phosphodiesterase activity *in vitro* and can functionally substitute for the equivalent domain in ns2 during mouse hepatitis virus infection (115). This domain of VP3 has been cocrystallized with its substrate 2-5A, and its activity *in vitro* has been corroborated (116). The role of this protein during rotavirus infection of cultured MA104 cells has recently been demonstrated; even though the OAS/RNase L pathway became activated during infection, rotavirus was able to counteract this pathway through the phosphodiesterase activity of VP3, which prevented the activation of RNase L (**Figure 3b**) (51). The recent finding that the C-terminal domain of VP3 contains 2',5'-phosphodiesterase activity that degrades the activators of RNase L, in addition to its role as a capping enzyme, makes this protein a multifunctional enzyme that contributes to the virulence and the innate immune evasion mechanisms of rotaviruses. It remains to be seen how common this countermeasure is among different rotavirus strains and whether it is functional *in vivo* in rotavirus-infected animals.

Rotavirus NSP3 and Inhibition of Cellular Protein Synthesis

In addition to the elegant mechanisms by which viral proteins target a specific group of antiviral responses, a bolder and less specific strategy takes place during infection. Early in the infection process, rotaviruses take over the host translation machinery, shutting off cell protein synthesis, which, among other consequences, prevents the translation of the mRNAs induced during the IFN response of the cell. The two main checkpoints for controlling the cell translation apparatus are the initiation of polypeptide synthesis, in particular the activity of the eukaryotic initiation factor (eIF) eIF2, and the formation of the eIF4F complex, both of which are frequent targets of control by viruses (reviewed in 117, 118).

Rotavirus mRNAs are capped at their 5' end but do not contain a poly(A) tail at the 3' end; instead, they have at their 3' end a consensus sequence (GACC) that is conserved in all 11 viral genes and is specifically recognized by the N-terminal domain of the nonstructural protein NSP3 (119). This viral protein also binds through its C-terminal domain to eIF4GI, a component of the eIF4F complex, in the same region used by the poly(A)-binding protein (PABP) but with higher affinity (120, 121). Thus, it has been proposed that, during rotavirus infection, NSP3 evicts PABP from eIF4G, impairing the translation of cellular mRNAs and enhancing the translation of rotavirus mRNAs (120–122). But this story might not be so straightforward. Silencing NSP3 in infected cells by RNA interference can restore cellular protein synthesis, as expected; however, and unexpectedly, it does not decrease the synthesis of viral protein but rather increases the amount of infectious virus produced (123). Furthermore, it has been reported that, in rotavirus-infected cells, PABP (123–125) and poly(A)-containing mRNAs accumulate in the nucleus through a still undefined mechanism that depends on the presence of NSP3 (126). The direct interaction of NSP3 with eIF4G and its involvement in the relocalization of PABP and poly(A)-containing mRNAs to the nucleus clearly have an inhibitory effect on the synthesis of cellular proteins (**Figure 3c**).

The shutoff of cell protein synthesis induced by rotaviruses is also mediated by a second mechanism; early in the infection, the α subunit of eIF2 (eIF2 α) becomes phosphorylated and is maintained in this state throughout the viral replication cycle (125). The continuous phosphorylated status of eIF2 α might be beneficial for the virus because under these conditions the viral mRNAs are efficiently translated but the synthesis of most cellular proteins is arrested. The dsRNA-dependent protein kinase PKR has been identified as the kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus-infected MA104 cells (54), as well as in IECs (127). In PKR^{-/-} MEFs, or in cells in which the expression of PKR had been knocked down by RNA interference, the phosphorylation of eIF2 α was prevented, but neither viral protein synthesis nor viral replication was affected (**Figure 3c**) (54). In addition to PKR's role in inhibiting translation, it might have an additional role during rotavirus infection. It has been found that in PKR^{-/-} MEFs there was no secretion of IFN β despite the presence of several antiviral genes induced by IRF3 and NF κ B, and it was proposed that PKR could play a direct or indirect part in the secretory phase of IFN β (45). In contrast, a different study using adult PKR^{-/-} knockout mice infected with a simian rotavirus showed that IFN β levels and viral replication were not different from those in infected wild-type mice. Again, differences in the experimental models, as well as in the viral strains used, might account for the different conclusions reached, thus emphasizing the need to further explore the role of PKR during rotavirus infection.

CONCLUDING REMARKS

There is no doubt that rotaviruses have found ways to successfully replicate in their hosts, evading the innate immune response that is deployed against them. It is not a simple task to escape the

multiple branches of the innate immune response, but rotaviruses have developed several specific measures on several fronts to dodge antiviral cell strategies. And yet it is also clear that host cells manage to keep the infection under control, because in many cases, a defect in any of the factors involved in controlling viral replication appears to result in a more aggressive infection. Close coevolution between rotaviruses and their hosts has occurred over a very long time, and this is clearly evidenced when homologous versus heterologous infections are compared. Indeed, several of the molecules of the innate immune response used against these viruses have been unraveled through the characterization of the replication of rotavirus strains in cells of an origin different from the species from which the virus was isolated.

At least three viral proteins are committed to thwarting the innate immune response of the cell. NSP1 interacts with several members of the IFN signaling cascade, preventing the activation of transcription factors that, in turn, activate the synthesis of IFNs and cytokines in a proteasome-dependent or -independent manner and inhibiting the activity of ISGF3, thus blocking the activation of ISGs. The activity of VP3 as a capping enzyme protects viral mRNAs from being detected by RLRs early in the infection, and then its 2',5'-phosphodiesterase activity inactivates the unique molecules (2-5As) that turn on the activity of the harmful RNase L. Finally, NSP3, by preventing the interaction of cellular mRNAs with the initiation complex eIF4F, and by causing the accumulation of PABP and poly(A)-containing mRNAs in the cell nucleus, prevents the translation of most cellular mRNAs, thus blocking the translation of many of the transcripts induced during the IFN response of the cell.

There is still a long way to go to completely understand the defense components of the host response to rotaviruses, in particular in the human host. Years of work using animal models and susceptible cells have provided preliminary and interesting picture of host-rotavirus struggles, but the elements that restrict virus replication and the ways in which the virus contends with them remain obscure. The use of different rotavirus strains and study models has partly complicated comparisons between studies; moreover, methodological advances that make possible the analysis of the host cell response at a single-cell level, instead of characterizing the response of pooled and usually heterogeneous cells, will allow us to have a clearer picture of the details of the virus-cell battle. Clearly, characterization of the innate immune response of cells to invading rotaviruses is a work in progress, in which new host and viral defense components and activities will be discovered.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors are not aware of any affiliations, memberships, funding, or financial holdings that might be perceived as affecting the objectivity of this review.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in our laboratory relevant to this article was supported by grants 153639 and 221019 from the National Council for Science and Technology (CONACyT), Mexico, and grant IG-200114 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM).

LITERATURE CITED

1. Lee LA, Franzel L, Atwell J, Datta SD, Friberg IK, et al. 2013. The estimated mortality impact of vaccinations forecast to be administered during 2011–2020 in 73 countries supported by the GAVI alliance. *Vaccine* 31(Suppl. 2):B61–72

2. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, et al. 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
3. Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, et al. 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 381:1405–16
4. Babji S, Kang G. 2012. Rotavirus vaccination in developing countries. *Curr. Opin. Virol.* 2:443–48
5. Estes MK, Greenberg HB. 2013. Rotaviruses and their replication. In *Fields Virology*, ed. DN Knipe, PM Howley, pp. 1347–401. Philadelphia: Wolters Kluwer
6. Bridger JC, Dhaliwal W, Adamson MJ, Howard CR. 1998. Determinants of rotavirus host range restriction—a heterologous bovine NSP1 gene does not affect replication kinetics in the pig. *Virology* 245:47–52
7. Bridger JC, Tauscher GI, Desselberger U. 1998. Viral determinants of rotavirus pathogenicity in pigs: evidence that the fourth gene of a porcine rotavirus confers diarrhea in the homologous host. *J. Virol.* 72:6929–31
8. Broome RL, Vo PT, Ward RL, Clark HF, Greenberg HB. 1993. Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence. *J. Virol.* 67:2448–55
9. Ciarlet M, Estes MK, Barone C, Ramig RF, Conner ME. 1998. Analysis of host range restriction determinants in the rabbit model: comparison of homologous and heterologous rotavirus infections. *J. Virol.* 72:2341–51
10. Feng N, Sen A, Wolf M, Vo P, Hoshino Y, Greenberg HB. 2011. Roles of VP4 and NSP1 in determining the distinctive replication capacities of simian rotavirus RRV and bovine rotavirus UK in the mouse biliary tract. *J. Virol.* 85:2686–94
11. Feng N, Yasukawa LL, Sen A, Greenberg HB. 2013. Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *J. Virol.* 87:8307–16
12. Hoshino Y, Saif LJ, Kang SY, Sereno MM, Chen WK, Kapikian AZ. 1995. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology* 209:274–80
13. Offit PA, Blavat G, Greenberg HB, Clark HF. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol.* 57:46–49
14. Wang W, Donnelly B, Bondoc A, Mohanty SK, McNeal M, et al. 2011. The rhesus rotavirus gene encoding VP4 is a major determinant in the pathogenesis of biliary atresia in newborn mice. *J. Virol.* 85:9069–77
15. Arias CF, Silva-Ayala D, Lopez S. 2015. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *J. Virol.* 89:890–93
16. Baker M, Prasad BV. 2010. Rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343:121–48
17. Lopez S, Arias CF. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12:271–78
18. Lopez S, Arias CF. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309:39–66
19. Heaton PM, Goveia MG, Miller JM, Offit P, Clark HF. 2005. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 192(Suppl. 1):S17–21
20. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, et al. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101–5
21. Takeuchi O, Akira S. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 227:75–86
22. Kawasaki T, Kawai T, Akira S. 2011. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 243:61–73
23. O'Neill LA, Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7:353–64
24. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, et al. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6:981–88
25. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell* 122:669–82

26. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling. *Mol. Cell* 19:727–40
27. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461:788–92
28. Randall RE, Goodbourn S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89:1–47
29. O'Neill LA, Bowie AG. 2010. Sensing and signaling in antiviral innate immunity. *Curr. Biol.* 20:R328–33
30. Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–20
31. Donnelly RP, Kotenko SV. 2010. Interferon- λ : a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 30:555–64
32. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, et al. 2003. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4:69–77
33. Pestka S. 2007. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J. Biol. Chem.* 282:20047–51
34. Wack A, Terczynska-Dyla E, Hartmann R. 2015. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat. Immunol.* 16:802–9
35. Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S. 2007. The receptor of the type I interferon family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316:71–95
36. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, et al. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4:63–68
37. Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC. 2004. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon- λ 1: similarities with type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 279:32269–74
38. Kotenko SV. 2011. IFN- λ s. *Curr. Opin. Immunol.* 23:583–90
39. Schoggins JW. 2014. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 6:40–46
40. Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. 2013. Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol. Rev.* 255:25–39
41. Hermant P, Michiels T. 2014. Interferon- λ in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J. Innate Immun.* 6:563–74
42. Mahlakoiv T, Hernandez P, Gronke K, Diefenbach A, Staeheli P. 2015. Leukocyte-derived IFN- α/β and epithelial IFN- λ constitute a compartmentalized mucosal defense system that restricts enteric virus infections. *PLoS Pathog.* 11:e1004782
43. Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. 2011. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J. Immunol.* 186:1618–26
44. Hirata Y, Broquet AH, Menchen L, Kagnoff MF. 2007. Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through RIG-I/IPS-1 in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 179:5425–32
45. Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB. 2011. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J. Virol.* 85:3717–32
46. Di Fiore IJ, Holloway G, Coulson BS. 2015. Innate immune responses to rotavirus infection in macrophages depend on MAVS but involve neither the NLRP3 inflammasome nor JNK and p38 signaling pathways. *Virus Res.* 208:89–97
47. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, et al. 2006. 5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994–97
48. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, et al. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997–1001
49. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, et al. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* 205:1601–10
50. 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
51. Sanchez-Tacuba L, Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2015. Rotavirus controls activation of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L pathway using at least two distinct mechanisms. *J. Virol.* 89:12145–53

52. Uzri D, Greenberg HB. 2013. Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors. *PLoS ONE* 8:e69825
53. Li W, Manktelow E, von Kirchbach JC, Gog JR, Desselberger U, Lever AM. 2010. Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential *cis*-acting functions. *Nucleic Acids Res.* 38:7718–35
54. Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2010. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus infection. *J. Virol.* 84:10457–66
55. Kordasti S, Istrate C, Banasaz M, Rottenberg M, Sjovall H, et al. 2006. Rotavirus infection is not associated with small intestinal fluid secretion in the adult mouse. *J. Virol.* 80:11355–61
56. Vancott JL, McNeal MM, Choi AH, Ward RL. 2003. The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J. Interferon Cytokine Res.* 23:163–70
57. Pott J, Stockinger S, Torow N, Smoczek A, Lindner C, et al. 2012. Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. *PLoS Pathog.* 8:e1002670
58. Deal EM, Jaimes MC, Crawford SE, Estes MK, Greenberg HB. 2010. Rotavirus structural proteins and dsRNA are required for the human primary plasmacytoid dendritic cell IFN α response. *PLoS Pathog.* 6:e1000931
59. Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, Gewirtz AT. 2015. MyD88-mediated TLR signaling protects against acute rotavirus infection while inflammasome cytokines direct Ab response. *Innate Immun.* 21:416–28
60. Arnold MM, Sen A, Greenberg HB, Patton JT. 2013. The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS Pathog.* 9:e1003064
61. Holloway G, Coulson BS. 2013. Innate cellular responses to rotavirus infection. *J. Gen. Virol.* 94:1151–60
62. Sen A, Rothenberg ME, Mukherjee G, Feng N, Kalisky T, et al. 2012. Innate immune response to homologous rotavirus infection in the small intestinal villous epithelium at single-cell resolution. *PNAS* 109:20667–72
63. De Boissieu D, Lebon P, Badoual J, Bompard Y, Dupont C. 1993. Rotavirus induces α -interferon release in children with gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 16:29–32
64. La Bonnardiere C, Cohen J, Contrepois M. 1981. Interferon activity in rotavirus infected newborn calves. *Ann. Rech. Vétérinaires* 12:85–91
65. Frias AH, Vijay-Kumar M, Gentsch JR, Crawford SE, Carvalho FA, et al. 2010. Intestinal epithelia activate anti-viral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components. *Mucosal Immunol.* 3:622–32
66. Feng N, Kim B, Fenaux M, Nguyen H, Vo P, et al. 2008. Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. *J. Virol.* 82:7578–90
67. Angel J, Franco MA, Greenberg HB, Bass D. 1999. Lack of a role for type I and type II interferons in the resolution of rotavirus-induced diarrhea and infection in mice. *J. Interferon Cytokine Res.* 19:655–59
68. Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, et al. 2011. IFN- λ determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *PNAS* 108:7944–49
69. Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, et al. 2009. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J. Virol.* 83:6987–94
70. Bass DM. 1997. Interferon γ and interleukin 1, but not interferon α , inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines. *Gastroenterology* 113:81–89
71. Egli A, Santer DM, O'Shea D, Tyrrell DL, Houghton M. 2014. The impact of the interferon- λ family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg. Microbes Infect.* 3:e51
72. Lasfar A, Zloza A, Cohen-Solal KA. 2016. IFN- λ therapy: current status and future perspectives. *Drug Discov. Today* 21:167–71
73. Sommereyns C, Paul S, Stachel P, Michiels T. 2008. IFN- λ (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* 4:e1000017

74. Hernandez PP, Mahlakoiv T, Yang I, Schwierzeck V, Nguyen N, et al. 2015. Interferon- λ and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat. Immunol.* 16:698–707
75. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, et al. 2014. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* 346:861–65
76. Lopez S, Arias CF. 2012. Rotavirus–host cell interactions: an arms race. *Curr. Opin. Virol.* 2:389–98
77. Morelli M, Ogden KM, Patton JT. 2015. Silencing the alarms: innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. *Virology* 479:75–84
78. Dunn SJ, Cross TL, Greenberg HB. 1994. Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization. *Virology* 203:178–83
79. Graff JW, Ewen J, Ettayebi K, Hardy ME. 2007. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J. Gen. Virol.* 88:613–20
80. Morelli M, Dennis AF, Patton JT. 2015. Putative E3 ubiquitin ligase of human rotavirus inhibits NF- κ B activation by using molecular mimicry to target β -TrCP. *mBio* 6:e02490
81. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME. 2002. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J. Virol.* 76:9545–50
82. Arnold MM, Barro M, Patton JT. 2013. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *J. Virol.* 87:9813–21
83. Barro M, Patton JT. 2005. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *PNAS* 102:4114–19
84. Barro M, Patton JT. 2007. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J. Virol.* 81:4473–81
85. Yanai H, Negishi H, Taniguchi T. 2012. The IRF family of transcription factors: inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncimmunology* 1:1376–86
86. Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. 2009. Rotavirus NSP1 inhibits NF κ B activation by inducing proteasome-dependent degradation of β -TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 5:e1000280
87. Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C. 2012. It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol. Rev.* 246:59–76
88. Kanarek N, Ben-Neriah Y. 2012. Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs. *Immunol. Rev.* 246:77–94
89. Hayden MS, Ghosh S. 2012. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26:203–34
90. Bour S, Perrin C, Akari H, Strebel K. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF- κ B activation by interfering with β TrCP-mediated degradation of I κ B. *J. Biol. Chem.* 276:15920–28
91. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Pignatelli B. 2009. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its β -TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog.* 5:e1000574
92. Mansur DS, Maluquer de Motes C, Unterholzner L, Sumner RP, Ferguson BJ, et al. 2013. Poxvirus targeting of E3 ligase β -TrCP by molecular mimicry: a mechanism to inhibit NF- κ B activation and promote immune evasion and virulence. *PLoS Pathog.* 9:e1003183
93. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, et al. 1998. A novel human WD protein, h- β TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* 1:565–74
94. Tang W, Pavlish OA, Spiegelman VS, Parkhitko AA, Fuchs SY. 2003. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/ β -TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 278:48942–49
95. Kumar KG, Krolewski JJ, Fuchs SY. 2004. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* 279:46614–20

96. Cui W, Xiao N, Xiao H, Zhou H, Yu M, et al. 2012. β -TrCP-mediated IRAK1 degradation releases TAK1-TRAF6 from the membrane to the cytosol for TAK1-dependent NF- κ B activation. *Mol. Cell Biol.* 32:3990-4000
97. Bagchi P, Bhowmick R, Nandi S, Kant Nayak M, Chawla-Sarkar M. 2013. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NF κ B activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology* 444:41-44
98. Xie P. 2013. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J. Mol. Signal.* 8:7
99. Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. 2013. Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *J. Virol.* 87:6840-50
100. Sen A, Feng N, Ettayebi K, Hardy ME, Greenberg HB. 2009. IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation. *J. Virol.* 83:10322-35
101. Qin L, Ren L, Zhou Z, Lei X, Chen L, et al. 2011. Rotavirus nonstructural protein 1 antagonizes innate immune response by interacting with retinoic acid inducible gene I. *J. Virol.* 85:526
102. Nandi S, Chanda S, Bagchi P, Nayak MK, Bhowmick R, Chawla-Sarkar M. 2014. MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1. *PLOS ONE* 9:e92126
103. Stark GR, Darnell JE Jr. 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36:503-14
104. Holloway G, Truong TT, Coulson BS. 2009. Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF- κ B. *J. Virol.* 83:4942-51
105. Holloway G, Dang VT, Jans DA, Coulson BS. 2014. Rotavirus inhibits IFN-induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin- α . *J. Gen. Virol.* 95:1723-33
106. Sen A, Rott L, Phan N, Mukherjee G, Greenberg HB. 2014. Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation. *J. Virol.* 88:41-53
107. Desselberger U. 2014. Rotaviruses. *Virus Res.* 190:75-96
108. Ogden KM, Snyder MJ, Dennis AF, Patton JT. 2014. Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3. *J. Virol.* 88:9072-85
109. Chen D, Luongo CL, Nibert ML, Patton JT. 1999. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265:120-30
110. Spencer E, Garcia BI. 1984. Effect of S-adenosylmethionine on human rotavirus RNA synthesis. *J. Virol.* 52:188-97
111. Imai M, Akatani K, Ikegami N, Furuichi Y. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47:125-36
112. Silverman RH. 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* 81:12720-29
113. Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH. 2011. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J. Interferon Cytokine Res.* 31:49-57
114. Silverman RH, Weiss SR. 2014. Viral phosphodiesterases that antagonize double-stranded RNA signaling to RNase L by degrading 2-5A. *J. Interferon Cytokine Res.* 34:455-63
115. Zhang R, Jha BK, Ogden KM, Dong B, Zhao L, et al. 2013. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *PNAS* 110:13114-19
116. Ogden KM, Hu L, Jha BK, Sankaran B, Weiss SR, et al. 2015. Structural basis for 2'-5'-oligoadenylate binding and enzyme activity of a viral RNase L antagonist. *J. Virol.* 89:6633-45
117. Dever TE. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108:545-56
118. Walsh D, Mohr I. 2011. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:860-75
119. 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
120. Graft CM, Burley SK. 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* 9:1273-83
121. 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

122. 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
123. Montero H, Arias CF, Lopez S. 2006. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 80:9031–38
124. Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, et al. 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
125. Montero H, Rojas M, Arias CF, Lopez S. 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82:1496–504
126. Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, Lopez S. 2013. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J. Virol.* 87:6336–45
127. Vijay-Kumar M, Gentsch JR, Kaiser WJ, Borregaard N, Offermann MK, et al. 2005. Protein kinase R mediates intestinal epithelial gene remodeling in response to double-stranded RNA and live rotavirus. *J. Immunol.* 174:6322–31