



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

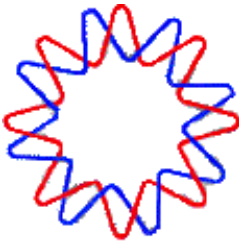
---

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterización de los mecanismos que utiliza  
rotavirus para mantener la fosforilación del  
factor eIF2 $\alpha$

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A  
**MARGARITO ROJAS JACINTO**



Director de Tesis: Dra. Susana López Charretón



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

Dedicada a mis papas Tomás y Claudia, y a mis  
hermanos Claudia, Leticia, Javier y Araceli.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Susana López por su asesoría durante este proyecto y por todo lo bueno que eh aprendido de ella.

A los Drs. Rosa María del Ángel, Irma González, Tomás López y Ernesto Méndez por todos los comentarios, discusiones y sugerencias durante este trabajo.

A todo el grupo Arias/López, lo que están y los que se fueron por su amistad y porque hacen cada día de trabajo más agradable: Pedro, Rafa, Vicenta, Maruri, Mari-lo, Michelle, Pavel, Carlos, Susana, Tomás, Ernesto, Luis, Marina, Diana, Camilo, Daniela, Jesús, Andrea P, Andrea M, Diego, Héctor, Rocío, Marco Aurelio, Marco Antonio, Rodrigo, Lorena, Silvia, Ivonne, Yunuen, Gaby, Ana, Alfonso, Rosa, Miguel, Miguel O.

A los Drs. Lorena Gutiérrez, Juan Ernesto Ludert, Tzvetanka Dimitrova y José Luis Reyes por la revisión de esta tesis.

## Índice

Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción.....	7
Clasificación viral.....	7
Estructura viral.....	7
Patogénesis viral.....	9
Ciclo replicativo.....	10
Inicio de la traducción.....	13
Regulación del inicio de la traducción por eIF2 $\alpha$ .....	15
Virus y la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .....	17
Mecanismos virales que sobrepasan la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .....	20
Los rotavirus y eIF2 $\alpha$ .....	22
Objetivo.....	23
Materiales y Métodos.....	24
Resultados.....	32
Discusión.....	63
Perspectivas.....	69
Bibliografía.....	71
Anexo1.....	78
Anexo 2.....	86

## Resumen

El factor de inicio de la traducción 2 (eIF2), compuesto por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), representa un punto clave en la regulación del inicio de la síntesis de proteínas. Este factor recluta el tRNA<sup>met</sup> iniciador al ribosoma, proceso que es conservado en todas las células eucariontes. En condiciones de estrés, la subunidad  $\alpha$  de eIF2 es fosforilada, lo cual resulta en la inhibición de la síntesis de casi todas las proteínas. En células de mamífero, se han identificado cuatro cinasas de eIF2 $\alpha$ , cada una activada por diferentes estímulos. La cinasa que comúnmente es activada durante infecciones virales es PKR, la cual es inducida por RNA de doble cadena. Sin embargo, recientemente se ha descrito que las cinasas PERK y GCN2 (activadas por estrés en el retículo endoplásmico y disminución en la disponibilidad de aminoácidos, respectivamente) también pueden ser activadas en respuesta a infecciones virales. Para prevenir, el efecto negativo de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , algunos virus han desarrollado diferentes mecanismos que evitan la activación de las cinasas de eIF2 $\alpha$ , o bien incrementan la desfosforilación de este factor. En este trabajo, hemos encontrado que durante la infección por rotavirus, eIF2 $\alpha$  es fosforilado y aún en estas condiciones, la síntesis de proteínas virales y la replicación del virus son exitosas. Además encontramos que en células infectadas con rotavirus, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  es mediada por PKR, cinasa que aparentemente es activada por el RNA genómico de estos virus. El mecanismo por el cual la traducción de proteínas de rotavirus sobrepasa la fosforilación de eIF2 $\alpha$  sigue en estudio.

## Summary

The eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2), composed by three subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) represents a key point in the regulation of protein synthesis. This factor recruits the initiator tRNA<sup>met</sup> to the ribosome, process that is conserved in all eukaryotic cells. During stress conditions, the  $\alpha$ -subunit of eIF2 becomes phosphorylated, which results in the shut-off of almost all cellular protein synthesis. In mammalian cells, there are four eIF2 $\alpha$ -kinases, each one activated by different stimuli. The most common eIF2 $\alpha$ -kinase activated during viral infections is PKR that is induced by double-stranded RNA. More recently it has been shown that kinases PERK and GCN2, which are activated by stress in the endoplasmic reticulum, and amino acid starvation, respectively, can also be activated in response to viral infections. To prevent the negative effects of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, several viruses have evolved different mechanisms that either prevent the activation of eIF2 $\alpha$ -kinases or increase the de-phosphorylation rate of eIF2 $\alpha$ . In this work we have found that during rotavirus infection eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated, and yet under these conditions, neither virus protein synthesis nor virus yield were affected. Also, we found that most of the eIF2 $\alpha$  phosphorylation is due to the activity of PKR, which is apparently induced by the genomic RNA of rotavirus. The mechanism by which the translation of the viral proteins overcomes the eIF2 $\alpha$  phosphorylation is under study.



## **Introducción**

### **Clasificación viral**

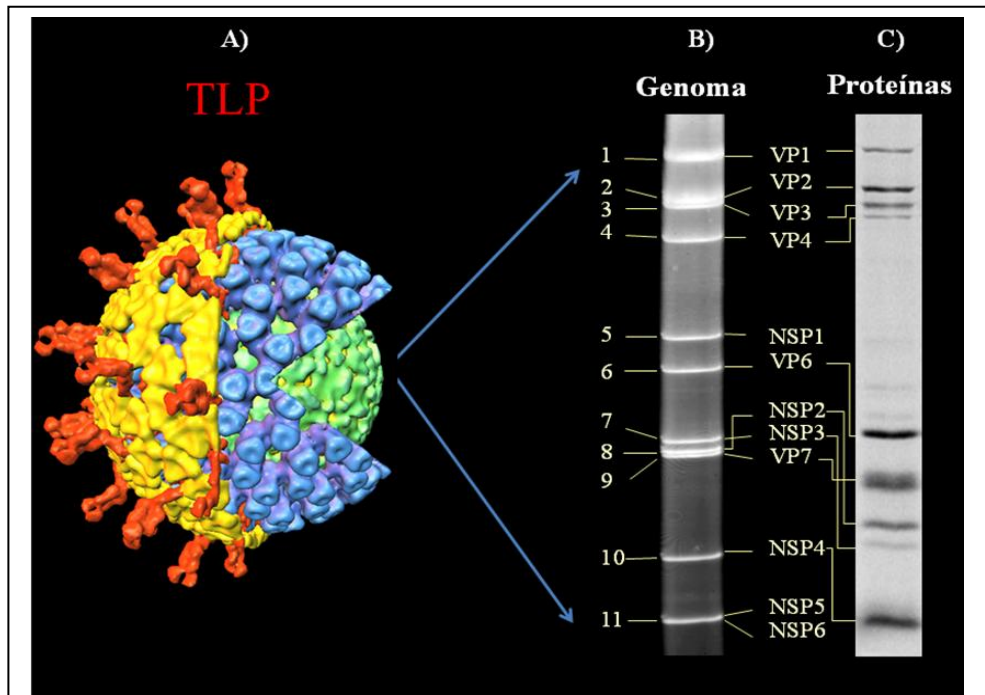
Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores al observar, al microscopio electrónico, biopsias de intestino delgado de niños que tenían diarrea de causa desconocida. Posteriormente se propuso el nombre de rotavirus (del latín *rota* = rueda) con base en su morfología y se les incluyó en la familia *Reoviridae*.

Los rotavirus están divididos genéticamente e inmunológicamente en siete serogrupos, del A al G. Los serogrupos A, B y C infectan humanos y otras especies animales, mientras que los serogrupos D, E, F y G aparentemente no infectan humanos. El serogrupo A de rotavirus es el más importante epidemiológicamente y por tanto es el que más se ha estudiado; este serogrupo está dividido en diferentes serotipos y genotipos basados en las proteínas que forman la capa externa del virus (Estes & Graham, 1985; Pedley *et al.*, 1983).

### **Estructura Viral**

La partícula infecciosa de aproximadamente 65-75 nm de diámetro, se compone de tres capas concéntricas de proteínas (Fig. 1A). El genoma de estos virus se compone de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc), que codifican para 6 proteínas estructurales (VPs por “viral protein”) y 6 proteínas no estructurales (NSPs por “Non Structural Protein”) (Fig.1 B y C). Este genoma se encuentra rodeado por la núcleo-cápside, la cual está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2, por pequeñas cantidades de VP1 que

funciona como RNA polimerasa, y por la guanilil-transferasa VP3. A su vez, la núcleo-cápside se encuentra rodeada por una capa intermedia compuesta de 780 moléculas de VP6 agrupadas en 260 trímeros. Las partículas de dos capas se conocen como DLPs (por sus siglas en inglés “Double layered particle”) y a ellas se les asocia la actividad de transcriptasa, ya que son la fuente del RNAm viral. La capa externa está compuesta por 780 moléculas de la glicoproteína VP7, de esta capa se proyectan 60 espículas formadas por trímeros de la hemaglutinina viral VP4. Las partículas de tres capas o TLPs (por sus siglas en inglés “Triple layered particle”) constituyen a una partícula infecciosa (Estes & Kapikian, 2006; Gilber *et al.*, 2001).



**Figura 1. Representación esquemática de los rotavirus.** A) Imagen de criomicroscopía electrónica de la estructura tridimensional de un virión maduro (TLP), se muestran las tres capas de rotavirus en diferentes colores. B) Patrón electroforético de los once segmentos de RNAdc del genoma viral. C) Autorradiografía de las proteínas codificadas por el genoma viral.

## Patogénesis viral

Los rotavirus representan el principal agente etiológico de gastroenteritis viral en niños menores de 2 años y en las crías de muchas especies animales, incluyendo algunas de importancia económica. La infección por rotavirus es muy común, el pico de incidencia en niños ocurre entre los 6 y los 24 meses de edad. Estos virus causan una enfermedad que se caracteriza por diarreas severas, fiebre, vómito y deshidratación. La severidad de la enfermedad varía desde una infección asintomática hasta una gastroenteritis que puede llevar a la muerte por deshidratación (Estes & Cohen, 1989). En países en desarrollo, los rotavirus son la causa del 30-70% de las hospitalizaciones por diarrea severa y son responsables de aproximadamente 527,000 muertes anuales (WHO, 2009).

El tropismo de los rotavirus está limitado principalmente a los enterocitos maduros, localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado; se ha propuesto que la diarrea causada por estos virus es consecuencia de la destrucción de estas células. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que al menos en parte, la diarrea es causada por la proteína no estructural NSP4 que estimula la secreción transepitelial de cloro por una vía dependiente de calcio desequilibrando el balance iónico de la célula y provocando la salida de agua. Aparentemente, todo esto sucede previo a la destrucción del epitelio intestinal (Estes & Cohen, 1989; Parashar *et al.*, 2003; Ramig, 2004).

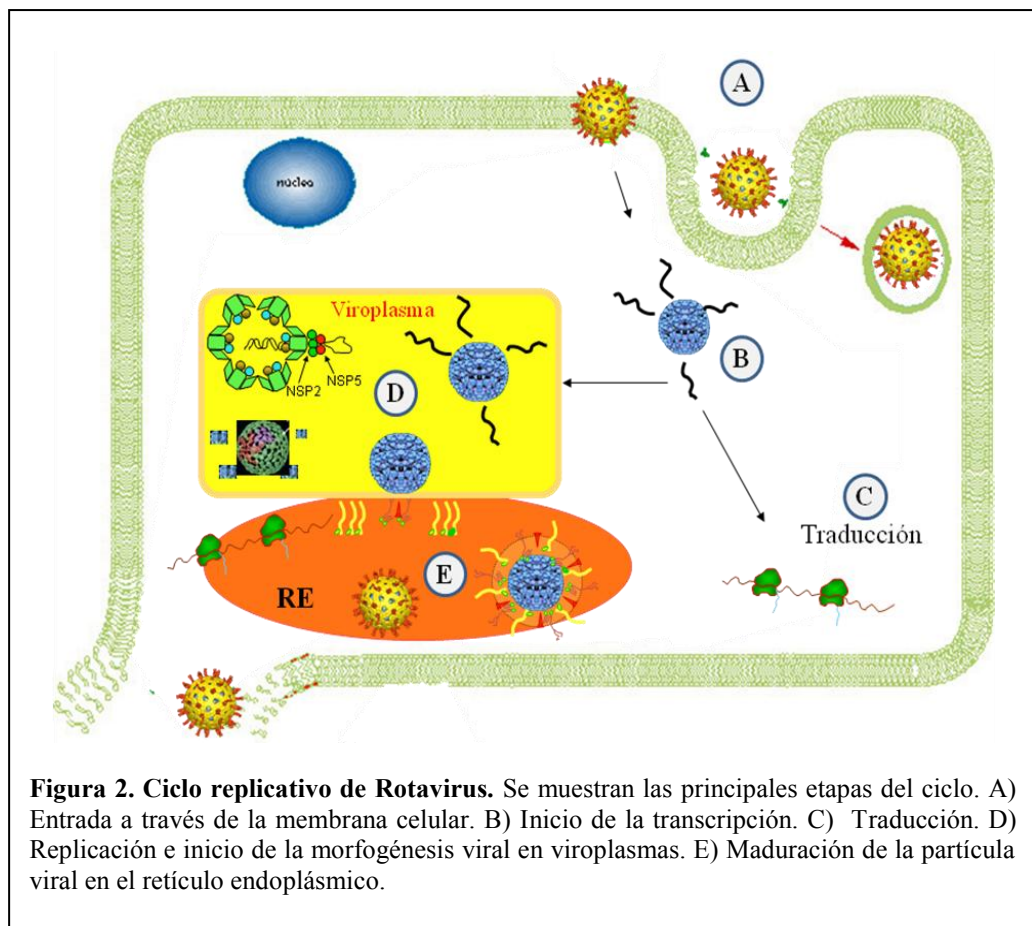
## Ciclo replicativo

**Unión y entrada.** Las infecciones virales inician con la unión del virus a su célula hospedera. En el caso de los rotavirus, este proceso es mediado por las proteínas VP4 y VP7 que secuencialmente se unen a diferentes receptores en la superficie celular. La correcta interacción de VP4 con sus receptores celulares requiere de un previo procesamiento con tripsina, lo cual origina dos péptidos, VP5 y VP8. Para algunas cepas de rotavirus, la primera interacción con su célula hospedera es a través del dominio VP8 y un receptor celular que contiene ácido siálico, probablemente un gangliósido. Se ha propuesto que esta primera interacción induce cambios conformacionales en VP4, que posteriormente permiten la interacción de su dominio VP5 con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Posterior a estas interacciones, el dominio VP5 interacciona con la chaperona Hsc70, y la proteína VP7 interacciona con las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$ ; sin embargo, el orden de estas interacciones no ha sido establecido (Lopez & Arias, 2004). La interacción del virus con diferentes receptores en la membrana celular promueve su endocitosis, la cual para algunas cepas es independiente de las proteínas clatrina y caveolina. Interesantemente, el proceso de entrada para la mayoría de las cepas de rotavirus requiere la participación de dinamina, proteína que escinde las vesículas de la membrana celular (Sanchez-San Martin *et al.*, 2004). Durante o poco después de la entrada, los rotavirus pierden la capa más externa quedando como DLPs en el citoplasma, partícula que es transcripcionalmente activa (Estes & Kapikian, 2006).

**Transcripción viral.** En el interior de las DLPs, la polimerasa viral VP1 utiliza los 11 segmentos de RNAdc como molde para sintetizar los RNAm, los cuales salen al citoplasma a través de canales formados por VP2. El marco de lectura abierto de cada gen está flanqueado por regiones 5' y 3' que no se traducen (UTRs) y que varían en longitud y secuencia entre cada segmento, aunque pequeñas secuencias (4-6 bases) en los extremos están conservadas entre todos los segmentos. Durante la infección, el RNAm tiene dos funciones, puede ser traducido a proteínas o ser utilizado como molde para la síntesis del RNAdc (Fig. 2). Se han localizado 3 señales en los RNAm importantes para la síntesis de RNAdc, dos de ellas incrementan la síntesis y una es esencial para la síntesis de la cadena negativa; además, se ha observado que las secuencias 5' UTR forman estructuras tallo-asa, igualmente importantes (Estes & Kapikian, 2006; Patton *et al.*, 1996).

**Replicación viral y morfogénesis.** En células infectadas, las proteínas virales NSP2 y NSP5 interaccionan entre sí y forman estructuras llamadas viroplasmos, donde otras proteínas y el RNA viral se acumulan y donde se lleva a cabo la replicación y el inicio de la morfogénesis viral (Fig. 2) (Silvestri *et al.*, 2004). La replicación inicia con la formación de los intermediarios de replicación (RI), llamados así por contar con actividad de replicasa. Los RIs llevan a cabo la síntesis del RNAdc tomando como molde los RNAm virales. Estos intermediarios se forman a partir de un complejo inicial denominado pre-coreRI que carece de actividad de replicación e incluye a las proteínas VP1 y VP3. A partir de éste se ensambla otro complejo que ya incluye las proteínas del núcleo viral llamado coreRI, el cual está constituido de VP1, VP2 y VP3 y puede tener asociadas las proteínas NSP2 y NSP5 (Patton, 2001). Se ha propuesto que NSP2 puede funcionar como un motor molecular que se une al RNAm viral y cataliza su empaquetamiento en las partículas recién

formadas (Schuck *et al.*, 2001). La adición de VP6 da lugar al complejo llamado VP6RI que posee actividad de replicación y transcripción, esta partícula da lugar a las DLPs formadas con las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 (Patton, 2001). En la etapa final de maduración, las DLPs geman hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) en un proceso dependiente de NSP4, proteína que funciona como receptor de la DLP. Durante este proceso, las DLPs adquieren una membrana transitoria de lípidos la cual incluye a las proteínas VP4, VP7 y NSP4. Posteriormente, por un mecanismo desconocido la membrana lipídica y NSP4 se pierden, y las DLPs selectivamente retienen a las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercera capa del virus. Finalmente los viriones maduros se acumulan en el lumen del RE hasta ser liberados (Fig.2) (Estes & Kapikian, 2006).



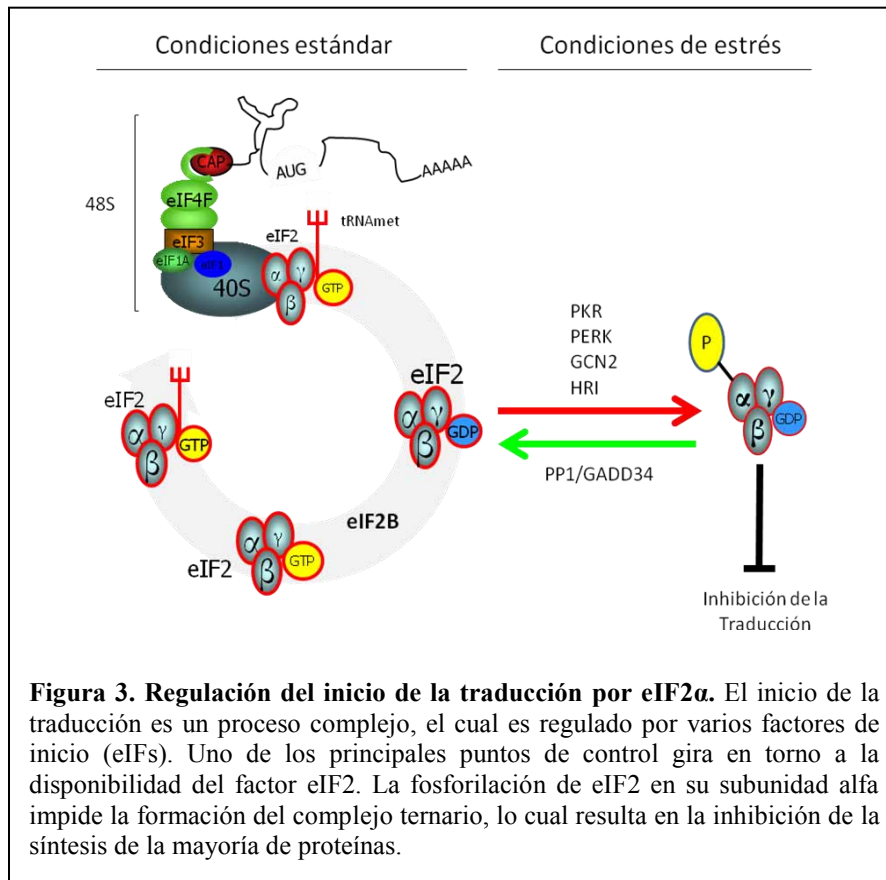
**Traducción viral.** Al igual que todos los virus hasta ahora conocidos, los rotavirus no cuentan con un mecanismo propio para la síntesis de sus proteínas, por lo cual requieren hacer uso de la maquinaria celular para este fin. Los RNAm virales pueden traducirse en ribosomas libres en el citoplasma (para la mayoría de las proteínas) o en ribosomas asociados al retículo endoplásmico, para las proteínas NSP4 y VP7. Los RNAm de rotavirus tienen CAP en su extremo 5', pero carecen de la cola de Poly A en el extremo 3'; en su lugar los mensajeros virales tienen la secuencia consenso UGACC3' (Poncet, 2003). Previamente, se sugirió que la proteína NSP3 se unía a esta secuencia consenso para promover la síntesis de proteínas virales; sin embargo, estudios recientes indican que la unión de NSP3 al RNAm viral no juega un papel importante en la síntesis de proteínas virales. Por otro lado, esta proteína es necesaria para inhibir la síntesis de proteínas celulares ya que se une al factor eIF4G y desplaza a la proteína PABP (Montero *et al.*, 2006).

### **Inicio de la traducción**

La síntesis de proteínas se puede dividir en tres etapas: el inicio, el alargamiento y la terminación. El inicio de la traducción involucra la interacción de varios factores de inicio (eIFs), el RNAm, el ribosoma y el RNA de transferencia (tRNA). En esta etapa, el ribosoma recorre el RNAm hasta encontrar el codón de inicio AUG, donde se colocará el primer aminoácido de la cadena polipeptídica (Groppo & Richter, 2009; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Los eventos mejor descritos del inicio de la traducción son: la formación del complejo ternario eIF2/GTP/tRNA<sup>met</sup> (TC por sus siglas en inglés “Ternary complex”) y la formación del complejo eIF4F. El TC se encarga de reclutar el tRNA<sup>met</sup>

iniciador al ribosoma, mientras que el complejo eIF4F funciona como enlace entre el ribosoma y el RNAm. Uno de los componentes del TC es la GTPasa eIF2, que se une a una molécula de GTP formando el estado activo eIF2/GTP, lo cual facilita su interacción con el tRNA<sup>met</sup>. El TC interactúa con la subunidad ribosomal 40S, dando origen al complejo 43S. La función principal del TC es colocar el tRNA<sup>met</sup> iniciador en el sitio P del ribosoma, lugar donde se favorecerá la interacción codón/anti-codón (Groppo & Richter, 2009; Pestova *et al.*, 2007; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). El complejo eIF4F se compone de las proteínas: eIF4A que cuenta con actividad de helicasa necesaria para eliminar estructuras secundarias en el RNAm; eIF4E que tiene afinidad por la estructura CAP del RNAm y eIF4G que funciona como proteína de andamiaje del complejo eIF4F (Gradi *et al.*, 1998). El complejo eIF4F se une al RNAm a través de la proteína eIF4E formando un complejo que posteriormente se une a la subunidad ribosomal 43S originando al complejo de inicio de la traducción 48S. Este nuevo complejo recorre el RNAm hasta localizar el codón de inicio AUG en un contexto apropiado. Una vez encontrado éste, ocurre la hidrólisis de GTP por eIF2 y el tRNA<sup>met</sup> es colocado en el sitio P del ribosoma (Mohr, 2006; Prevot *et al.*, 2003). Posteriormente, el complejo inactivo eIF2/GDP es liberado al citoplasma donde puede ser reciclado. Para participar otra vez en el inicio de la traducción, el complejo eIF2/GDP debe ser cambiado a su forma activa eIF2/GTP, este proceso es mediado por el factor intercambiador de nucleótido, eIF2B (Fig. 3) (Prevot *et al.*, 2003).





### Regulación del inicio de la traducción por eIF2 $\alpha$

La síntesis de proteínas es un proceso constitutivo; sin embargo, puede verse afectado por diferentes cambios en las condiciones fisiológicas. Algunos de estos cambios incluyen: reducción en la disponibilidad de nutrientes, infecciones bacterianas o virales, acumulación de proteínas mal plegadas y cambios en temperatura o en la concentración de algunos metabolitos, entre otros. La primera respuesta celular ante algún tipo de estrés es detener la síntesis de la gran mayoría de proteínas; sin embargo, en estas condiciones también se promueve la producción de algunas proteínas que ayudan a contender con el estrés o en su defecto, proteínas que conducen a la muerte celular (Cnop *et al.*, 2007;

Kaufman, 1999). En el caso de infecciones virales, la inhibición de la síntesis de proteínas representa el primer mecanismo de defensa innato, cuyo objetivo es evitar la propagación del agente viral (Holcik & Sonenberg, 2005; Mohr, 2006). Uno de los mecanismos más estudiados en la regulación del inicio de la traducción gira en torno a la disponibilidad de eIF2 para la formación del TC. En condiciones normales, como se mencionó antes, eIF2 participa en el inicio de la traducción de todos los RNAm de células eucariontes. eIF2 es un factor heterotrímico que comprende las subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y ante un estímulo que atente la integridad celular, la serina 51 de la subunidad  $\alpha$  es fosforilada lo que resulta en eIF2 $\alpha$  fosforilado (eIF2 $\alpha$ -P). En este estado, eIF2 $\alpha$ -P se convierte en un inhibidor competitivo de eIF2B y debido a que eIF2 $\alpha$  es más abundante que eIF2B, pequeñas cantidades de eIF2 $\alpha$ -P bloquean la actividad intercambiadora de nucleótido de eIF2B, con lo cual se acumula el complejo inactivo eIF2/GDP. Dado que eIF2/GTP es necesario para la formación del TC que a su vez se requiere para reclutar el tRNA<sup>met</sup> durante el inicio de la traducción, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  resulta en la inhibición de la síntesis de casi todas las proteínas (Fig. 3) (Proud, 2005).

Actualmente, se conocen cuatro cinasas capaces de fosforilar al factor eIF2 $\alpha$ , las cuales son activadas por diferentes estímulos. La cinasa GCN2 (por sus siglas en inglés, general control non-derepressible-2) es activada en respuesta a la baja disponibilidad de aminoácidos. El mecanismo de su activación involucra la unión del tRNA no cargado al dominio HisRS de GCN2 (Dever & Hinnebusch, 2005; Wek *et al.*, 1995). La cinasa HRI (por sus siglas en inglés, heme-regulated inhibitor) se activa en ausencia del grupo hemo y en condiciones generales de hipoxia (Lu *et al.*, 2001). La cinasa PKR (por sus siglas en inglés, double-stranded RNA kinase), considerada como uno de los principales centinelas

en contra de las infecciones virales, es activada en respuesta a la presencia de RNAdc (Williams, 1999). En condiciones basales, esta cinasa se encuentra como monómero en el citoplasma celular; sin embargo, en presencia de RNAdc, dos monómeros de PKR se unen al RNAdc, lo cual resulta en la dimerización de PKR que a su vez promueve la autofosforilación y activación de la actividad cinasa de PKR. Una vez activa, PKR es capaz de fosforilar al factor eIF2 $\alpha$  y en consecuencia apagar la síntesis de casi todas las proteínas (Dey *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Finalmente, la cinasa PERK (por sus siglas en inglés, PKR-like kinase) se activa en respuesta a condiciones de estrés en el retículo endoplásmico, principalmente la acumulación de proteínas mal plegadas (Ron, 2002).

La contraparte de estas cinasas está representada por la fosfatasa PP1 y los cofactores Crep o GADD34. Se ha demostrado que el complejo PP1/Crep promueve la defosforilación de eIF2 $\alpha$  en células no estresadas, mientras que el complejo PP1/GADD34 remueve el grupo fosfato de eIF2 $\alpha$ -P de células que han sido estresadas y que han regresado a su estado basal. Con la des-fosforilación de eIF2 $\alpha$ -P, el TC puede formarse nuevamente y la síntesis de proteínas reinicia (Brush *et al.*, 2003; Jousse *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2001)

### **Virus y la fosforilación de eIF2 $\alpha$**

La replicación de los virus ocurre en el núcleo o en el citoplasma celular, y en la mayoría de los casos su ciclo replicativo está estrechamente ligado al retículo endoplásmico. Las infecciones virales representan uno de los mayores conflictos a los que las células se enfrentan. Por un lado, las células inducen diferentes respuestas, las cuales frecuentemente convergen en la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , al mismo tiempo, promueven la

síntesis de proteínas anti-virales y en general proteínas que ayuden en la remediación del estrés generado por la infección. Por otro lado, los virus requieren apoderarse de la maquinaria de traducción celular para la síntesis de sus proteínas, al mismo tiempo que evitan la síntesis de proteínas anti-virales y la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .

El primer mecanismo de defensa celular en contra de las infecciones virales involucra la activación de la cinasa PKR; sin embargo, recientemente se ha observado que algunas infecciones virales resultan en la activación de PERK y GCN2, cinasas que pueden contribuir en la defensa celular al fosforilar al factor eIF2 $\alpha$  y detener la síntesis de proteínas (Berlanga *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2005; Kraehling *et al.*, 2009). Los virus han explotado diversos mecanismos cuyo objetivo es evitar la acumulación del factor eIF2 $\alpha$  fosforilado, principalmente mediante la inactivación de PKR (Tabla I). No obstante, otros mecanismos más generales también son capaces de contrarrestar la actividad de cualquiera de las cinasas de eIF2 $\alpha$  al inducir la des-fosforilación de este factor.

Vaccinia y los herpes virus (HSV-1) son quizá los virus más estudiados en cuanto a mecanismos que previenen la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Vaccinia codifica para la proteína K3L que es estructuralmente similar a eIF2 $\alpha$ ; pero carece de un sitio fosfo-aceptor. De esta forma, K3L actúa como un pseudosustrato de las cinasas de eIF2 $\alpha$  (Carroll *et al.*, 1993; Gunnery *et al.*, 1990; Ramelot *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 1998). Además, este virus también codifica para la proteína E3L, cuya función es unirse y enmascarar al RNAdc al mismo tiempo que se une a PKR y evita su activación (Beattie *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995; Lloyd & Shatkin, 1992). Por su parte, los herpes virus codifican para la proteína US11, la cual interactúa directamente con PKR previniendo su activación en respuesta a RNAdc

(Poppers *et al.*, 2000). Sin embargo, la estrategia de este virus que más ha llamado la atención, es la producción de una proteína llamada  $\gamma 34.5$ . Esta proteína mimetiza a la proteína celular GADD34, de modo que  $\gamma 34.5$  es capaz de reclutar a la fosfatasa PP1 y de esta forma promover la des-fosforilación de eIF2 $\alpha$ -P (He *et al.*, 1997; Romano *et al.*, 1998). Al actuar directamente sobre el factor eIF2 $\alpha$ -P, el complejo  $\gamma 34.5$ /GADD34 es capaz de contrarrestar la actividad de cualquiera de las cinasas de eIF2 $\alpha$ . Interesantemente, se han generado virus mutantes que carecen de los genes que codifican para US11 y  $\gamma 34.5$  y aún así son capaces de prevenir la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , sugiriendo que éstos virus utilizan al menos otro mecanismo para evitar dicha fosforilación (Mulvey *et al.*, 2006). Los diferentes mecanismos que los virus han explotado en la prevención de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , son resumidos en la tabla I.

**TABLA I**

<b>Mecanismo</b>	<b>Virus</b>	<b>Factor viral</b>	<b>Referencia</b>
Unión e inactivación de PKR	Vaccinia HSV-1 HHV8 HCV Adenovirus Epstein Barr virus HIV	E3L US11 vIRF-2 NS5A VA RNA <sub>1</sub> EBER RNA TAR RNA	(Lu <i>et al.</i> , 1995) (Poppers <i>et al.</i> , 2000) (Burysek & Pitha, 2001) (Gale <i>et al.</i> , 1998) (Schneider <i>et al.</i> , 1985) (Sharp <i>et al.</i> , 1993) (Gunnery <i>et al.</i> , 1990)
Proteínas de unión y enmascaramiento de RNAdc	Vaccinia HSV-1 Influenza virus Reovirus	E3L US11 NS1 $\sigma 3$	(Beattie <i>et al.</i> , 1995) (Poppers <i>et al.</i> , 2000) (Bergmann <i>et al.</i> , 2000) (Lloyd & Shatkin, 1992)
Homólogos de eIF2 $\alpha$	Vaccinia Swine Pox virus Myxoma virus	K3L C8L M156R	(Romano <i>et al.</i> , 1998) (Kawagishi-Kobayashi <i>et al.</i> , 2000) (Ramelot <i>et al.</i> , 2002)
Des-fosforilación de eIF2 $\alpha$	HSV-1	$\gamma 34.5$	(He <i>et al.</i> , 1997)
Inducción de inhibidores celulares de PKR y PERK	Influenza virus	?	(Melville <i>et al.</i> , 1999) (Tan & Katze, 1998)
Degradación de PKR	Poliovirus	?	(Black <i>et al.</i> , 1989)
Relocalización de PKR	Cytomegalovirus	TRS1	(Hakki <i>et al.</i> , 2006)

## **Mecanismos virales que sobrepasan la fosforilación de eIF2 $\alpha$**

Así como algunos virus han desarrollado estrategias para prevenir la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , algunos virus no son capaces de ello, por lo que han desarrollado mecanismos que sobrepasan el bloqueo impuesto por la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un claro ejemplo de esto; durante la infección tardía por este virus, eIF2 $\alpha$  es fosforilado y esto correlaciona con una reducción pero no inhibición de la síntesis de proteínas virales. Algunos autores sugieren que la fosforilación de este factor podría promover el ensamble de las partículas infecciosas, lo cierto es que los RNAm de VSV pueden traducirse aún en estas condiciones y para lograrlo modifican la función intercambiadora de nucleótido de eIF2B (Balachandran & Barber, 2004; Connor & Lyles, 2005). eIF2B se compone de 5 subunidades, de las cuales la  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$  funcionan como sub-complejo sensor de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , mientras que las subunidades  $\epsilon$  y  $\gamma$  funcionan como sub-complejo catalítico (Proud, 2005). Durante la infección por VSV, la expresión de la subunidad  $\epsilon$  de eIF2B es incrementada notoriamente. Por si sola esta subunidad es capaz de realizar el intercambio de nucleótido de eIF2 $\alpha$ ; sin embargo, no es capaz de sensor su estado de fosforilación (Fabian *et al.*, 1997; Pavitt *et al.*, 1998). De manera que, la sobre-expresión de eIF2B $\epsilon$  permite la disponibilidad de eIF2 $\alpha$  para la formación del TC y por ende para el inicio de la traducción de proteínas de VSV (Balachandran & Barber, 2004).

La evolución de otros virus los ha llevado a prescindir del factor eIF2, de modo que su fosforilación no afecta la síntesis de sus proteínas, tal es el caso del virus de la parálisis del grillo (CrPV) y los Alfavirus. En el primer caso, los RNAm de CrPV poseen estructuras

tipo IRES que les permiten iniciar la síntesis de proteínas de una forma peculiar. A diferencia de otros IRES virales, el RNAm de CrPV se caracteriza por prescindir de todos los factores de inicio de la traducción. Interesantemente, el mensajero de estos virus forma una estructura compleja, la cual se asemeja al tRNA<sup>met</sup>. Esta estructura se sitúa en el sitio P del ribosoma y funciona como cebador del inicio de la traducción. Esta característica le permite a este mensajero prescindir del TC y por lo tanto las proteínas de este virus no inician con el aminoácido metionina (Sasaki & Nakashima, 1999; Wilson *et al.*, 2000). Otra estrategia para superar la fosforilación de eIF2 $\alpha$  es el uso de una proteína que sustituya la función de este factor, tal es el caso de los Alfavirus. Durante la infección por estos virus se ha demostrado que el factor eIF2 $\alpha$  es fosforilado en una forma dependiente de la cinasa PKR, y al estar inactivo este factor, los Alfavirus son capaces de utilizar la proteína eIF2A en lugar de eIF2 para reclutar el tRNA<sup>met</sup> al ribosoma. Adicionalmente, se ha encontrado que el RNA subgenómico 26S de estos virus posee una secuencia que forma una estructura tallo-asa y al menos en parte esta estructura hace la traducción de este RNA independiente del estado de fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Ventoso *et al.*, 2006).

La lista de virus que inducen la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante su ciclo replicativo va en aumento. Ejemplo de éstos son el virus de la hepatitis de ratón (MHV), el virus Eastern equine encephalitis virus (EEEV), Simian Virus 40, SARS-coronavirus y los rotavirus (Aguilar *et al.*, 2007; Krahling *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2008; Raaben *et al.*, 2007; Swaminathan *et al.*, 1996). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual estos virus superan la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la síntesis de sus proteínas.

Además de las infecciones virales, existen otras condiciones donde la síntesis de proteínas es exitosa aún cuando el factor eIF2 $\alpha$  es fosforilado. Se ha demostrado que en tejidos cancerosos de colon o recto eIF2 $\alpha$  se encuentra fosforilado; sin embargo, en estos tejidos la síntesis de proteínas es exitosa. Los autores de este trabajo encontraron que en estas células el factor fosforilado se encuentra acumulado en el núcleo, sugiriendo que en el citoplasma se encuentra el factor no fosforilado útil para la traducción de proteínas (Lobo *et al.*, 2000).

### **Los rotavirus y eIF2 $\alpha$**

Recientemente, en nuestro laboratorio hemos encontrado que durante la infección por rotavirus, eIF2 $\alpha$  se fosforila desde las primeras horas post-infección y se mantiene así durante todo el ciclo replicativo, y si bien se inhibe la síntesis de la mayoría de las proteínas celulares, la síntesis de proteínas de rotavirus es muy eficiente (Montero *et al.*, 2008) (anexo I). La inhibición de la expresión de VP2, NSP2 o NSP5 (mediante interferencia de RNA) en células infectadas con rotavirus resulta en la reducción de la síntesis de proteínas virales, RNAm y RNAdc sugiriendo un papel esencial de estas proteínas en el ciclo replicativo de rotavirus (Ayala-Breton *et al.*, 2009; Campagna *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2008; Silvestri *et al.*, 2004). Adicionalmente, el silenciamiento de VP2, NSP2 o NSP5 reduce notablemente la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , sugiriendo que el RNA viral o alguna de estas proteínas son necesarias para inducir o mantener la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Montero *et al.*, 2008). Así, el propósito de este trabajo se centra en determinar el mecanismo por el cual los rotavirus inducen la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ .



## **OBJETIVO**

- 1. CARACTERIZAR EL MECANISMO POR EL QUE LA INFECCIÓN CON ROTAVIRUS INDUCE Y MANTIENE EL ESTADO FOSFORILADO DEL FACTOR eIF2 $\alpha$ .**

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1 Identificar el componente o evento viral que induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .
- 1.2 Evaluar el efecto de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  sobre el ciclo replicativo de los rotavirus.
- 1.3 Identificar la(s) cinasa(s) responsable(s) de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus.
- 1.4 Identificar el mecanismo de traducción de las proteínas de rotavirus aún en condiciones de fosforilación de eIF2 $\alpha$ .

## **Materiales y Métodos**

### **Líneas celulares y anticuerpos**

Las líneas celulares HEK-293, COS-7 y MA104 fueron crecidas en medio Advanced Dulbecco modified Eagle de alta glucosa (DMEM) suplementado con 4% de suero fetal bovino (FBS). Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) silvestres (S/S) y mutantes (A/A) de eIF2 $\alpha$  fueron obtenidos del laboratorio del Dr. N. Sonenberg, McGill University, Montreal, Canada. Los MEFs silvestres (PKR $+/+$ ) y mutantes (PKR $-/-$ ) de la kinasa PKR fueron obtenidos del laboratorio del Dr. A.E. Koromilas, McGill University, Montreal, Canada. Los fibroblastos silvestres (PERK $+/+$ ) y mutantes (PERK $-/-$ ) de la cinasa PERK fueron obtenidos del laboratorio del Dr. D. Ron, New York University, New York, USA. Los MEFs fueron crecidos en medio (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de FBS (inactivado) y aminoácidos no esenciales. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-fosfo-eIF2 $\alpha$  de conejo, anti-eIF2 $\alpha$  de conejo, anti-S6 (54D2) de ratón y anti-fosfo-S6 de conejo (Ser235/236) de Cell Signaling (Boston, MA), anti-eIF2A de ratón (MOI) de Abnova (Taiwan), anti-eIF2B $\epsilon$  de ratón (B7), anti-PKR de ratón (B10) de Santa Cruz (Santa Cruz, CA) y anti-RNAdc de ratón (J2) de Scicons (Hungría). El suero policlonal anti-NSP5 y el suero policlonal anti-YM (C75) han sido descritos previamente (Gonzalez *et al.*, 2000). Los anticuerpos secundarios fueron, anti-conejo conjugado con peroxidasa A (Perkin Elmer, MA), anti-ratón conjugado con peroxidasa A (Zymed, Carlsbad, CA), anti-ratón acoplado a Alexa-568 o 488 y anti-conejo acoplado a Alexa-488 o 568 (Molecular Probes, Eugene, OR).

## **Cepas Virales**

Los rotavirus RRV, SA11 (cepas de simio) y Wa (cepa de humano) fueron suministrados por H.B. Greenberg, Universidad de Stanford, Palo Alto CA. La cepa bovina RF fue suministrada por J. Cohen, Laboratorio de Virología e Inmunología Molecular, Francia y la cepa porcina YM fue aislada en nuestro laboratorio. Los rotavirus fueron propagados en células MA104 tal como se ha descrito previamente (Pando *et al.*, 2002). Los lisados virales fueron activados con tripsina 10  $\mu$ l/ml, Gibco BRL durante 30 minutos a 37°C.

## **Determinación del título viral**

Para determinar el título viral de los lisados virales usados en este trabajo, monocapas de células MA104, COS-7, HEK-293 o MEFs se infectaron con diluciones seriadas de los diferentes rotavirus. A las 14-16 horas post infección (hpi), las células se fijaron con acetona al 80% durante 30 minutos, después se lavaron dos veces con PBS, se incubaron con el suero policlonal anti-YM (C75) en PBS por una hora a 37° C, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 1 h con el anti-conejo conjugado con peroxidasa A diluido en PBS y finalmente se lavaron con PBS. Para revelar las células infectadas, se usó 3-amino-9-etil-carbazole (Sigma) como sustrato para la peroxidasa, lo cual produce un precipitado en color café. La determinación del título viral se llevo a cabo contando al microscopio las células teñidas (focos infecciosos) en cada dilución. Para calcular el número de unidades formadoras de focos por mililitro (UFF/ml)

se utilizó la siguiente fórmula: No. de focos contados X dilución X 4.5 X 20 (Factor de volumen de 50  $\mu$ l) = UFF/ml. Para determinar el número de partículas infecciosas producidas en las diferentes líneas celulares, las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 3 virus/célula y 14-16 hpi las células se cosecharon por congelación. Los lisados obtenidos fueron tratados con 10  $\mu$ g/ml de tripsina durante 30 min a 37°C y el título viral de estos lisados se determinó infectando monocapas de células MA104 como se describió previamente.

### **Purificación de partículas virales y de RNA de doble cadena.**

Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en frascos de 150 cm<sup>2</sup> fueron infectadas y cosechadas 14-16 hpi. Los lisados virales fueron congelados y descongelados dos veces y las partículas virales fueron concentradas por centrifugación durante 1 h a 30,000 rpm a 4° C en un rotor SW40 (Beckman, Fullerton, CA). El botón obtenido fue resuspendido en la solución TNC (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>), luego fue sonificado durante 20 segundos y extraído con Genetron (trichloro-monofluoroethane). La solución obtenida se utilizó para purificar el RNA genómico, o las partículas virales. Para obtener el RNA genómico, la solución fue centrifugada sobre un colchón de sacarosa al 40% durante 1 h a 30,000 rpm en un rotor SW40. Posteriormente, el RNA genómico fue aislado del botón mediante dos extracciones con fenol/cloroformo. Para obtener las partículas de dos capas (DLPs), a la solución obtenida de la extracción de Genetron se le adicionó CsCl<sub>2</sub> para obtener una densidad de 1.36 g/cm<sup>3</sup> y la mezcla fue centrifugada durante 18 h a 35,000 rpm en un rotor SW40. Las bandas opalescentes,

correspondientes a las TLPs y DLPs fueron colectadas por punción, mezcladas y concentradas por centrifugación durante 1 h a 40,000 rpm. El botón fue resuspendido en 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 y se adicionó EGTA a una concentración de 3 mM durante 15 min a 37° C para remover la capa externa de las partículas, después la mezcla fue diluida con el amortiguador TNC y concentrada por centrifugación.

## **Transfecciones**

Para la transfección de plásmidos, monocapas de células COS-7 se transfectaron con 100 µl de una solución de 40 µg/ml de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 1 µg del plásmido pcDNA indicado en MEM sin suero (MEM s/s). Esta mezcla se adicionó sobre las células durante 6 h a 37° C, al cabo de este tiempo las células se lavaron dos veces con MEM (s/s) y fueron incubadas en MEM s/s por diferentes horas antes de cosechar las proteínas o montar las células para inmunofluorescencia. Para la transfección de los siRNAs, se preparó una mezcla de oligofectamina (15 µl/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 200 pmol/ml del siRNA indicado. Esta mezcla se incubó en placas de 48 pozos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se sembraron  $4 \times 10^4$  células MA104/ml sobre la solución de siRNAs, y se incubaron 72 h después las células fueron infectadas con el rotavirus RRV. Los RNA interferentes utilizados fueron: SMART pool siRNA contra eIF2 $\alpha$ , eIF2A y eIF5B (Dharmacon Research, Lafayette, CO), siRNA contra PKR y eIF2B $\epsilon$  de Ambion, Inc. (Austin, Texas). Para la transfección de RNA genómico de rotavirus, monocapas de células MA104 sembradas en placas de 48 pozos, o en platos de 15 cm, fueron incubadas con una mezcla de RNAdc (10 µg/ml) o Poly I:C (5 µg/ml) (Sigma Aldrich Co, St Lois MO), y lipofectamina (40 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después

de una hora, la mezcla fue reemplazada con MEM y las células fueron incubadas por diferentes tiempos antes de la cosecha. Para lipofectar DLPs, las partículas virales fueron diluidas en MEM a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  y lipofectamina 40  $\mu\text{g/ml}$ . Monocapas de células MA104 fueron incubadas con esta mezcla durante 1 h, posteriormente la mezcla fue reemplazada por MEM y las células fueron incubadas por distintos tiempos antes de ser cosechadas.

### **Marcaje metabólico**

Para analizar la síntesis de proteínas, monocapas de células crecidas en placas de 48 pozos, se infectaron (o no) con los virus indicados, o se trataron con arsenito de sodio, o con tapsigargina. Media hora antes de los tiempos de cosecha indicados, las células se incubaron durante 30 minutos con medio sin metionina suplementado con 25 $\mu\text{Ci/ml}$  de metionina  $^{35}\text{S}$  (Dupont NEN, Boston). Las células se lisaron como se indica en el protocolo siguiente y las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía y/o inmunoblot.

### **Inmunoblots**

Para lisar las células, éstas se incubaron durante 15 minutos con la solución de lisis (25 mM NaF, 1 mM NaOV, 50 mM Tris pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerol y 1% de Tritón X-100), suplementada con un coctel de inhibidor de proteasas (Compleat EDTA-free, Roche Indianápolis, IN). Los lisados fueron centrifugados

durante 5 minutos a 13,000 rpm y los sobrenadantes fueron colectados. Las muestras se diluyeron con la solución de carga (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol) y fueron hervidas por 5 minutos. Después de separar las proteínas por SDS-PAGE, éstas se transfirieron a una membrana inmobilon-NC (Millipore), durante 1 h a 130 mA, en amortiguador CAPS (10 mM, pH 11). Después de incubar la membrana con la solución de bloqueo (5% de BSA, PBS, 0.1% Tween 20) durante toda la noche a 4°C, se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante 12-24 h a 4°C. La membrana se lavó y se incubó con un anticuerpo conjugado con peroxidasa A (NEN) diluido en PBS 0.1%, Tween 20, 5% de leche. Al finalizar la incubación se hicieron 3 lavados con PBS 0.1% Tween 20 por 10 minutos. Finalmente las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Ligthing, según las instrucciones del proveedor (Perkin-Elmer) exponiendo en la película hipersensible X-Omat (Kodak).

### **Digestión de RNA**

La ribonucleasa III (RNasa III, de *E. coli*) fusionada a GST en el amino terminal fue clonada y purificada en nuestro laboratorio. La RNasa A fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para la digestión *in situ*, monocapas de células crecidas sobre cubreobjetos fueron fijadas y permeabilizadas como se indica en el protocolo siguiente. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 2 h a 37° C con 2  $\mu$ g/ml de RNasa III diluida en la solución (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA pH 7.9, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 5% glicerol), o fueron incubadas con 1  $\mu$ g/ml RNasa A diluida en PBS.

Para la digestión *in vitro*, TLPs, DLPs purificadas o RNAdc de rotavirus fueron incubadas con RNasa III o RNasa A tal como se describió previamente. Después de dos horas, el RNA genómico fue extraído y analizado por PAGE y tinción de plata, como se ha descrito previamente (Herring *et al.*, 1982).

### **Inmunofluorescencia**

Las células MA104 se crecieron sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro, los cuales fueron colocados en placas de 48 pozos. Una vez que las células alcanzaron la confluencia necesaria, se aplicó el tratamiento indicado (infección o transfección y/o digestión con RNasas). A diferentes tiempos post-tratamiento, las células se fijaron y tiñeron para inmunofluorescencia como se detalla a continuación: la monocapa celular se lavó con PBS y se fijó 20 minutos con una solución 2% de para-formaldehído (Sigma). Al finalizar el tiempo de fijación, las células se lavaron 4 veces con la solución de lavado (PBS, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM) y se permeabilizaron con la solución de bloqueo (PBS, 1% BSA, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM) suplementada con 0.5% tritón X-100. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa diluido en solución de bloqueo. Además, se utilizó el compuesto DAPI para teñir núcleos. Las células se lavaron y los cubre objetos con las células hacia abajo se montaron sobre un portaobjetos con Fluokept (Argene, France). Finalmente las preparaciones se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia E600 acoplado a una cámara digital DXM1200 (Nikon).



## **Purificación de subunidades ribosomales**

Monocapas de células MA104 crecidas en platos de 15 cm fueron infectadas o no con el rotavirus RRV, o fueron transfectadas con el RNA genómico de rotavirus o con Poly I:C durante 1h, o fueron tratadas con tapsigargina. Posteriormente las células fueron incubadas durante seis horas a 37° C. Tres minutos antes de cosechar, las células fueron incubadas con 100 µg/ml de cicloheximida, luego fueron lavadas tres veces con la solución A fría (20 mM Tris pH 7.8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/ml cicloheximida) y lisadas con la solución A complementada con 1 mg/ml de heparina, 0.5 mM de DTT, 0.5% Tritón X-100, 25 mM NaF, 1 mM OvNa, Complet EDTA-free (Roche, Indianápolis) y RNAsin (80U/ml) (Promega, Madison). Los lisados fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4° C, los sobrenadantes fueron cargados en gradientes discontinuos de sacarosa (10-50%) y centrifugados a 36,000 rpm durante 2 h en un rotor SW40. Los gradientes fueron fraccionados (Amershan AktaPrime UV-monitor, OD<sub>254</sub>) y se obtuvieron 22 fracciones por gradiente. El RNA fue aislado de cada fracción indicada por extracciones de fenol/cloroformo, y las proteínas fueron concentradas por precipitación con metanol/cloroformo.

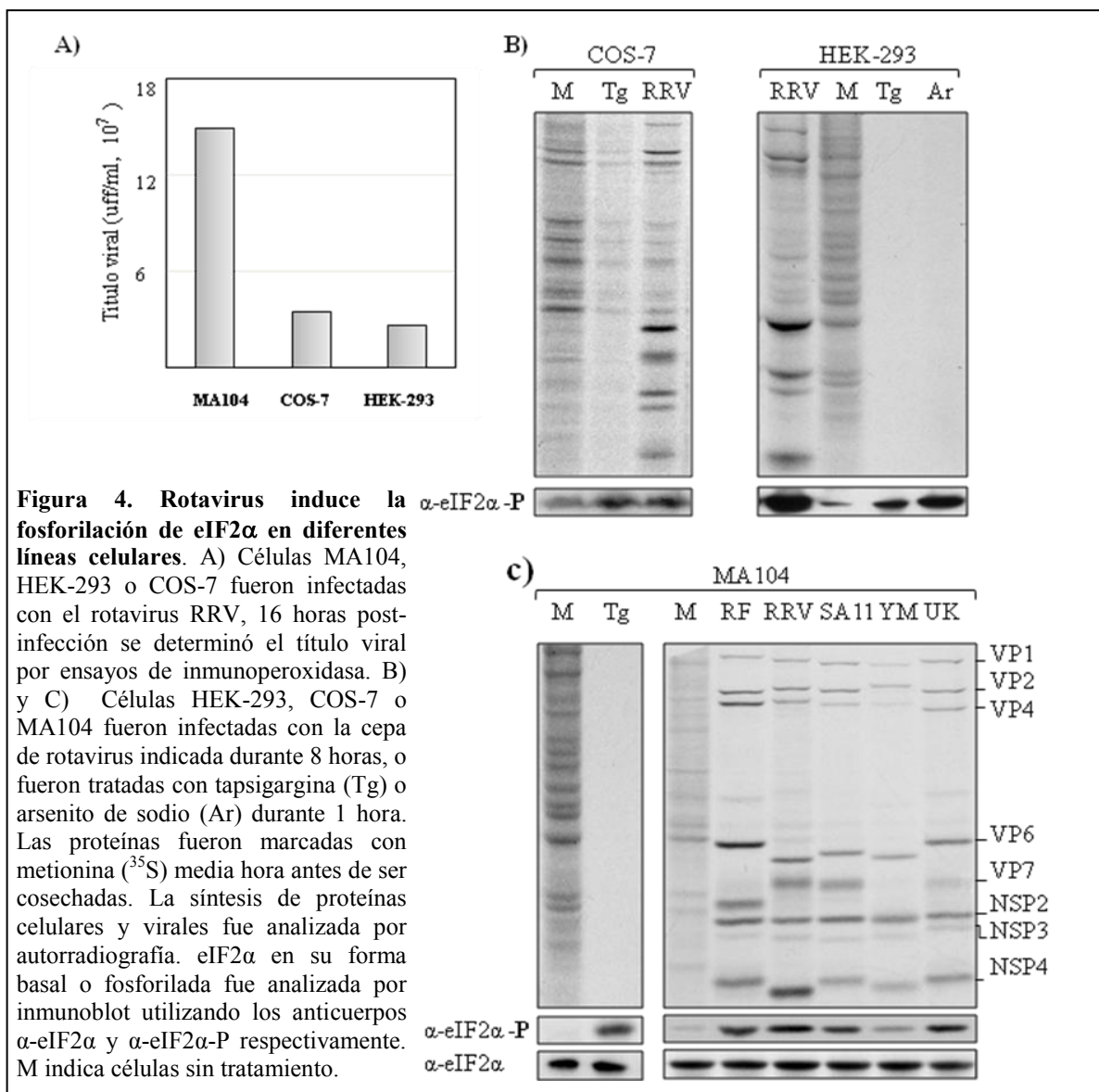
## Resultados

### Fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ durante la infección por rotavirus

Recientemente, en nuestro laboratorio hemos descrito que el factor eIF2 $\alpha$  de células MA104 se fosforila en respuesta a la infección por el rotavirus RRV (Montero *et al.*, 2008) (Anexo 1). Para probar si este fenómeno sucede en otros tipos celulares, monocapas de células HEK-293 y/o COS-7 (de riñón y carcinoma de colon humano) fueron infectadas con el rotavirus RRV o fueron tratadas con tapsigargina (Tg) o arsenito de sodio (Ar), como controles positivos de la inducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Estas líneas celulares se infectan menos que la línea celular MA104 (aproximadamente 10 veces menos) (Fig. 4A); sin embargo, tanto la infección por rotavirus como los tratamientos con Tg y Ar indujeron la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Fig. 4B). En ambos tipos celulares, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (inducida por tapsigargina o arsenito de sodio) resultó en la reducción de la síntesis de proteínas celulares (Fig. 4B). En contraste, la síntesis de proteínas virales fue eficiente, aún cuando eIF2 $\alpha$  se encuentra fosforilado (Fig. 4B).

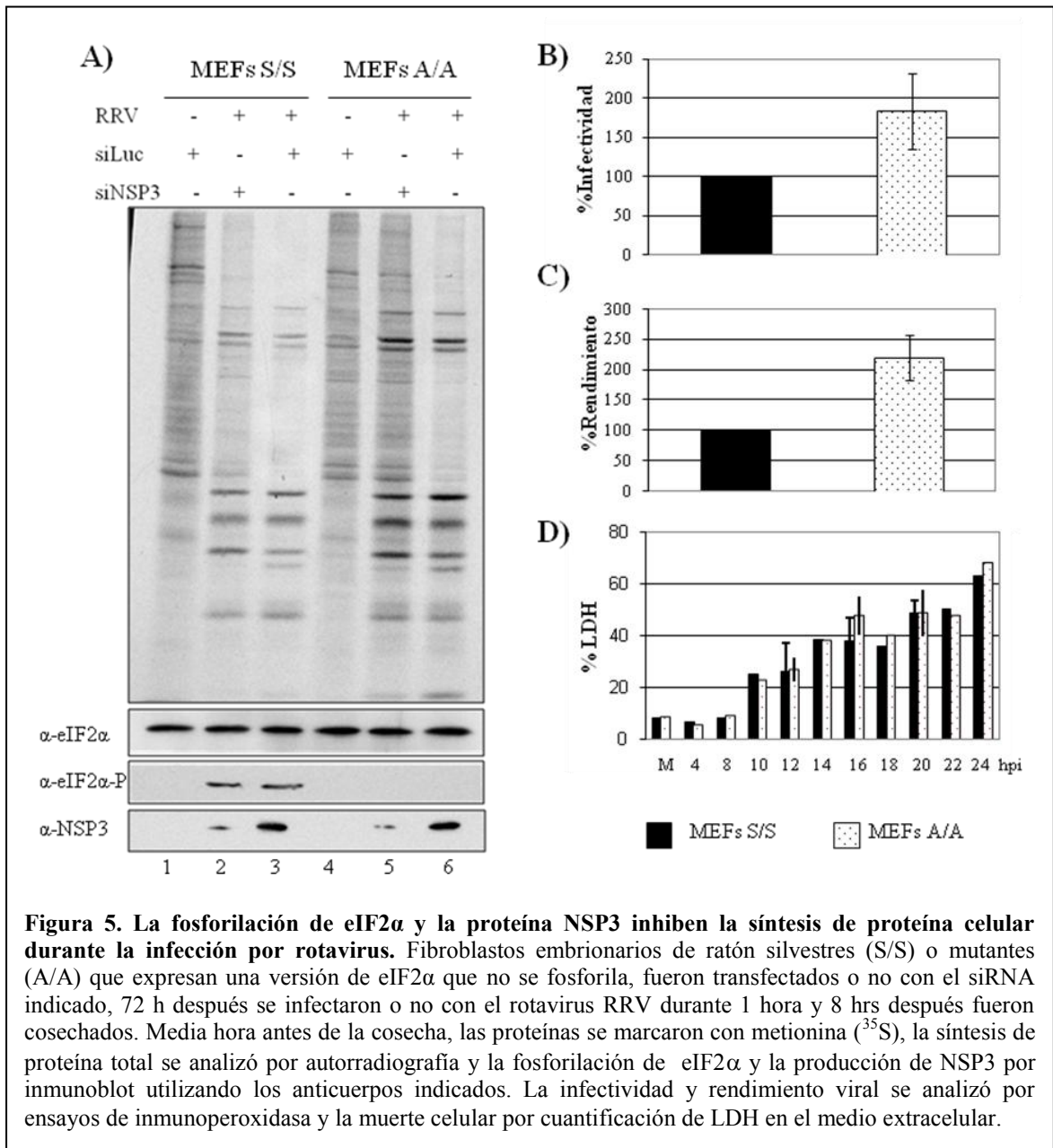
Para estudiar si este fenómeno era particular de la cepa RRV o se reproduce al infectar con otras cepas de rotavirus, monocapas de células MA104 fueron infectadas con cepas de rotavirus de diferentes orígenes animales: RRV (Simio), YM (Porcino), RF (Bovino), SA11 (Simio) y UK (Bovino) y se analizó el efecto de la infección sobre la síntesis de proteínas celulares por autorradiografía y la fosforilación de eIF2 $\alpha$  por inmunoblot. Encontramos que en estas células, los virus utilizados indujeron la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , y en todos los casos la síntesis de proteínas virales fue eficiente

(Fig. 4C). Además, se observó que el nivel de fosforilación de eIF2 $\alpha$  no correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Por ejemplo, la cepa de rotavirus YM induce fuertemente el apagamiento de la síntesis de proteínas celulares, pero induce ligeramente la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en comparación con la cepa de rotavirus RRV (Fig. 4C). Estos resultados sugieren que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en respuesta a la infección por rotavirus no es una particularidad de la cepa RRV y que cada cepa de rotavirus podría regular de forma diferente la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y la inhibición de la expresión de proteínas celulares.



## **La fosforilación de eIF2 $\alpha$ y la proteína NSP3 contribuyen a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, pero no son esenciales durante la infección por rotavirus**

La fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  en respuesta a la infección por rotavirus sugería que este fenómeno podría ser importante en la regulación de algún paso del ciclo replicativo del virus. Sin embargo, esta hipótesis fue descartada al observar que la síntesis de proteínas (Fig. 5A, comparar carril 3 y 6), la infectividad y el rendimiento viral del rotavirus RRV fue mayor en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) mutantes (A/A), que producen una versión de eIF2 $\alpha$  que no se fosforila (Fig. 5 B y C y Anexo 1). Estos resultados no se deben a una mayor muerte celular de las células silvestres (MEFs S/S), ya que la liberación de LDH al medio fue similar para ambas líneas celulares (Fig. 5D). En MEFs S/S o A/A, la infección por rotavirus indujo la inhibición de la síntesis de proteínas celulares; pero, esto fue más evidente en las células silvestres (Fig. 5A, comparar carril 3 y 6). Estos resultados sugieren que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  juega un papel importante en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección por rotavirus, pero no es el único elemento que participa, ya que en células donde el factor eIF2 $\alpha$  no se fosforila se sigue observando reducción en la síntesis de proteínas celulares (Fig. 5A, carriles 3 y 6).

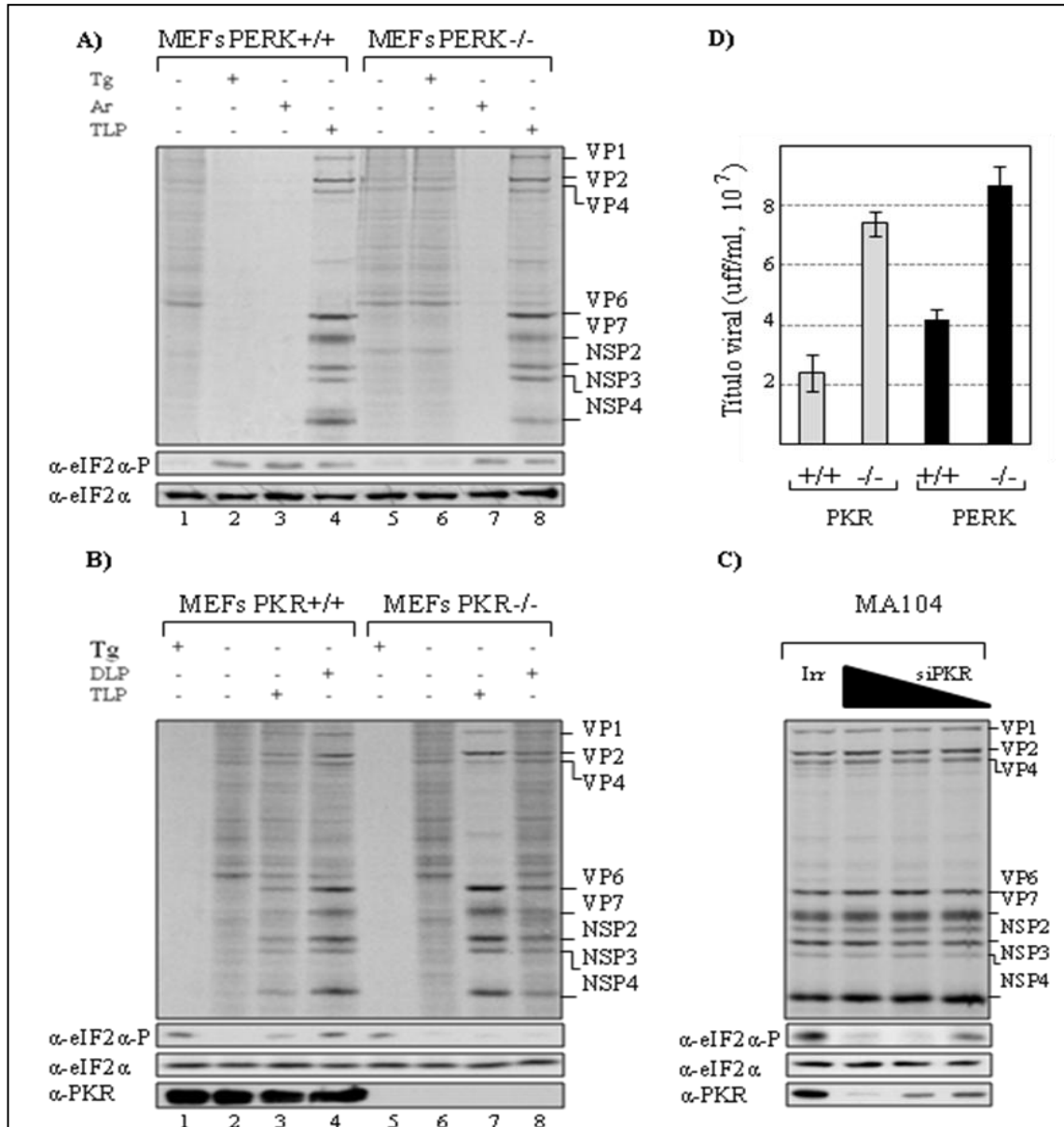


Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que en células MA104 infectadas con rotavirus, el silenciamiento de NSP3 reduce la inhibición de síntesis de proteínas celulares (Montero *et al.*, 2006). Esto sugiere que, la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección por rotavirus puede ser resultado de dos

componentes: la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  y la proteína NSP3. Para probar esta hipótesis evaluamos el efecto del silenciamiento de NSP3 en fibroblastos silvestres y mutantes. Al igual que en células MA104, en MEFs silvestres el silenciamiento de NSP3 redujo la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Fig. 5A, comparar carril 2 y 3, Anexo 1). Sin embargo, el nivel de síntesis de proteínas celulares no alcanzó el nivel observado en las células no infectadas (Fig. 5A, compare carril 1 y 2). Por otra parte, en MEFs A/A el silenciamiento de NSP3 evitó por completo la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Fig. 5A, compare carril 4 y 5). Estos resultados sugieren fuertemente que los dos componentes responsables de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección por rotavirus, son la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y la presencia de la proteína NSP3. Estos resultados fueron publicados en el Journal of Virology, (Montero *et al.*, 2008), Anexo 1.

### **La cinasa PKR fosforila al factor eIF2 $\alpha$ durante la infección por rotavirus**

La fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  a lo largo del ciclo replicativo de rotavirus sugiere que las cinasas que fosforilan a este factor podrían estar activas durante la infección. La etapa final de la morfogénesis de los rotavirus ocurre en el retículo endoplásmico, la membrana de este orgánulo se modifica por las proteínas VP7 y NSP4; además, durante la replicación del virus se produce RNA genómico compuesto de moléculas de RNAdc (Estes & Kapikian, 2006; Patton, 2003). Por ello, las cinasas que probablemente podrían fosforilar al factor eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus son PERK y PKR.



**Figura 6. La cinasa PKR fosforila al factor eIF2 $\alpha$  en respuesta a la infección por rotavirus.** Fibroblastos embrionarios de ratón silvestres (wt) o mutantes (A) PERK $^{-/-}$ , B) PKR $^{-/-}$ ) que carecen de la cinasa PERK o PKR, respectivamente, fueron infectados o no con partículas completas del virus RRV (TLP) o fueron transfectadas con partículas de dos capas (DLP) durante 1 h, ocho horas después las células fueron cosechadas. Alternativamente, las células fueron tratadas con arsenito de sodio (Ar) o tapsigargina (Tg) durante 1 hora. C) Células MA104 fueron transfectadas o no con el siRNA indicado, 72 h después se infectaron o no con el rotavirus RRV durante 8 horas. Media hora antes de cosechar las células, las proteínas se marcaron con metionina ( $^{35}\text{S}$ ). La síntesis de proteína total se analizó por autorradiografía y la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y PKR por inmunoblot usando los anticuerpos indicados. D) La progenie viral producida en los diferentes MEFs fue analizada por ensayos de inmunoperoxidasa.

Para evaluar el papel de PERK en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por los rotavirus, MEFs silvestres (PERK $^{+/+}$ ) o mutantes (PERK $^{-/-}$ ), que carecen de la actividad cinasa de PERK fueron infectados con el rotavirus RRV. Ya que no contamos con un anticuerpo específico para la detección de PERK, el fenotipo de las células mutantes fue identificado utilizando tratamientos con taspigargina y arsenito de sodio, tratamientos que inducen la activación de las cinasas PERK y HRI respectivamente. Como se esperaba, el tratamiento con Ar resultó en la inducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en ambos tipos celulares (wt y mutantes) (Fig. 6A, líneas 3 y 7). En contraste, el tratamiento con taspigargina solo indujo la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en células silvestres y no en los MEFs PERK $^{-/-}$ , demostrando la ausencia de PERK en estos MEFs (Fig. 6A, líneas 2 y 6). La infección de ambas líneas celulares resultó en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Fig. 6A, líneas 4 y 8), lo que indica que la cinasa PERK no juega un papel importante en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus.

Para determinar si PKR era la cinasa involucrada en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus, MEFs silvestres (PKR $^{+/+}$ ) o mutantes (PKR $^{-/-}$ ) que carecen del dominio cinasa de PKR fueron infectados con el rotavirus RRV. En este caso, las células silvestres se infectaron aproximadamente 100 veces menos que las mutantes, esta diferencia se puede apreciar en la escasa síntesis de proteína viral producida en células silvestres (Fig. 6B, línea 3). A pesar de esto, logramos detectar inducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en estas células, pero no en células que carecen de PKR (Fig. 6B, línea 7). Para igualar el nivel de infección, ambas líneas celulares fueron transfectadas con partículas de doble capa (DLPs). Utilizando esta técnica obtuvimos un aumento en la



infección de las células silvestres, reflejado por el aumento de la síntesis de proteína viral producida y esto correlacionó con un aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Fig. 6B, línea 4). La baja fosforilación de eIF2 $\alpha$  en los MEFs PKR $^{-/-}$  infectados sugiere un papel importante de la cinasa PKR en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus (Fig. 6B, línea 7). Esta idea fue confirmada al silenciar la expresión de PKR en células MA104 infectadas con este virus. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la expresión de PKR ocurre en una forma dosis dependiente, esto no tiene efecto notable en la síntesis de proteínas de rotavirus; sin embargo, la disminución de esta cinasa afectó la cantidad de eIF2 $\alpha$  fosforilada (Fig. 6C). Todos, estos resultados indican que la cinasa PKR participa en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por los rotavirus, mientras que la cinasa PERK no es importante en este evento. A pesar de que las cinasas PERK y PKR no parecen influir en la síntesis de proteína viral, estas cinasas podrían tener un efecto negativo durante la infección, ya que la progenie viral fue mayor en las células que carecen de estas cinasas (Fig. 6D).

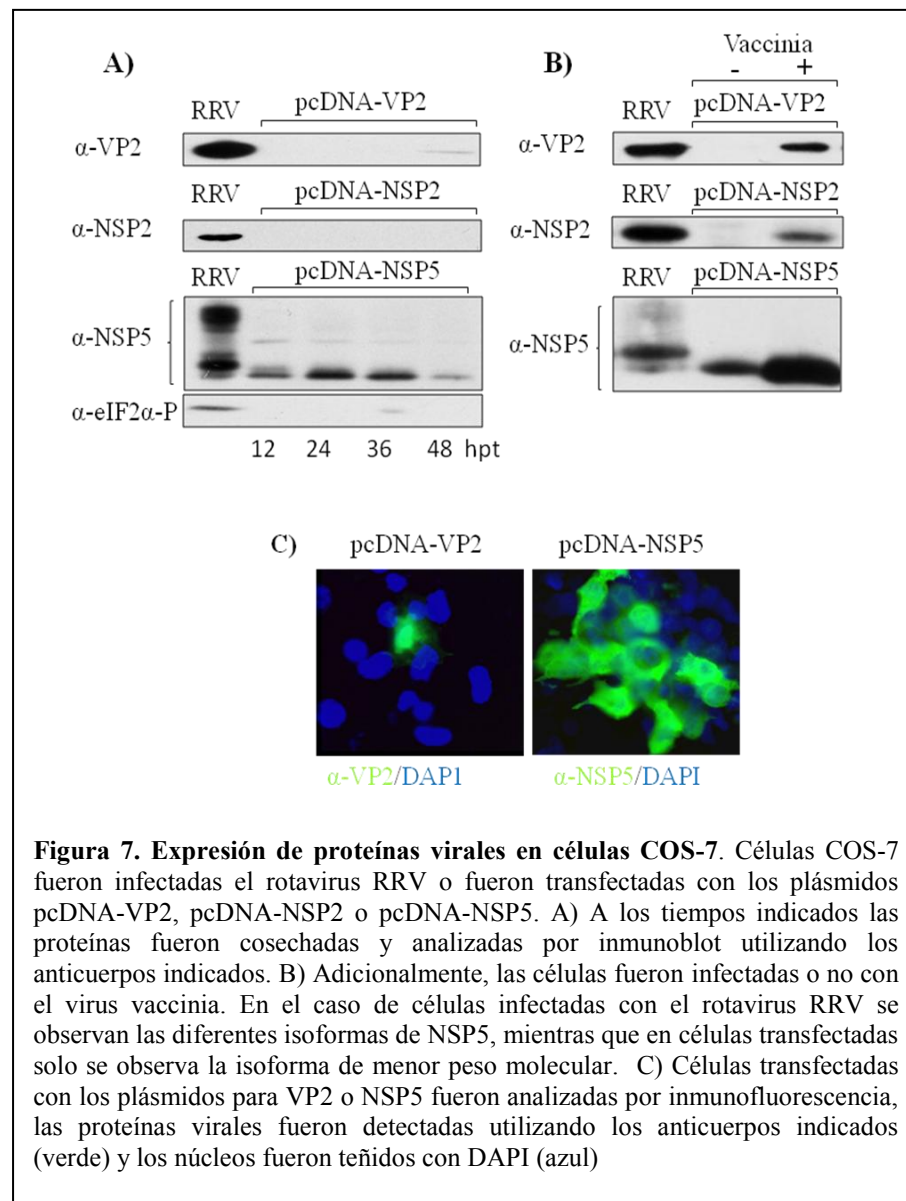
### **El RNAdc de rotavirus induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$**

Como se ha mencionado anteriormente, en células de mamífero la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  puede ser mediada por cuatro diferentes cinasas, las cuales son activadas por distintos estímulos. En el caso de células infectadas con rotavirus los estímulos posibles son: la entrada del virus a la célula (que incluye la unión y penetración del virus a la membrana celular), la acumulación de proteínas virales en el retículo endoplásmico, la

síntesis de RNA viral, las proteínas virales o en conjunto todos los eventos involucrados en el ciclo replicativo del virus.

Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que el silenciamiento de la expresión de las proteínas VP2, NSP2 o NSP5 en células MA104 infectadas con el rotavirus RRV reducía notablemente la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Montero *et al.*, 2008) (Anexo 1), sugiriendo que estas proteínas podrían tener un papel en la inducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Para analizar esta hipótesis, monocapas de células COS-7 (altamente permisibles a la transfección de plásmidos) fueron transfectadas con los plásmidos: pcDNA-VP2, pcDNA-NSP2 o pcDNA-NSP5 que codifican para las proteínas virales que su nombre indica. A diferentes horas post-transfección, las células se cosecharon y las proteínas se analizaron por inmunoblot. Sin embargo, en ninguna de las condiciones logramos observar la expresión de la proteína NSP2, y VP2 se observó sólo ligeramente a las 48 horas post-transfección (Fig. 7A). La expresión de VP2 y NSP2 solo se logró al co-infectar las células con el virus vaccinia recombinante, el cual codifica para la polimerasa T7, lo que nos permitió comprobar la funcionalidad de los plásmidos (pcDNA-VP2, pcDNA-NSP2) (Fig. 7B). Sin embargo, estas condiciones de expresión no fueron utilizadas para analizar la fosforilación de eIF2 $\alpha$  ya que el virus vaccinia tiene un mecanismo que evita dicha fosforilación (Carroll *et al.*, 1993; Gunnery *et al.*, 1990; Ramelot *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 1998). Por otra parte, la expresión de NSP5 se observó a partir de las 12 horas post-transfección en células COS-7 y a las 48 horas empezó a disminuir, probablemente porque se degrada o por que las células están dañadas a este tiempo (Fig. 7A), por inmunofluorescencia detectamos que aproximadamente 60% de células expresan esta proteína (Fig. 7C). En estas células que expresan NSP5, la

fosforilación de eIF2 $\alpha$  fue muy reducida o nula (Fig. 7A), lo que sugiere que la proteína NSP5 por sí sola no induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$ ; sin embargo, no podemos descartar que NSP5 dispare la fosforilación de eIF2 $\alpha$  cuando se encuentra en complejo con alguna otra proteína viral. Queda aún por estudiar si la expresión de VP2 o NSP2 son suficientes para inducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .

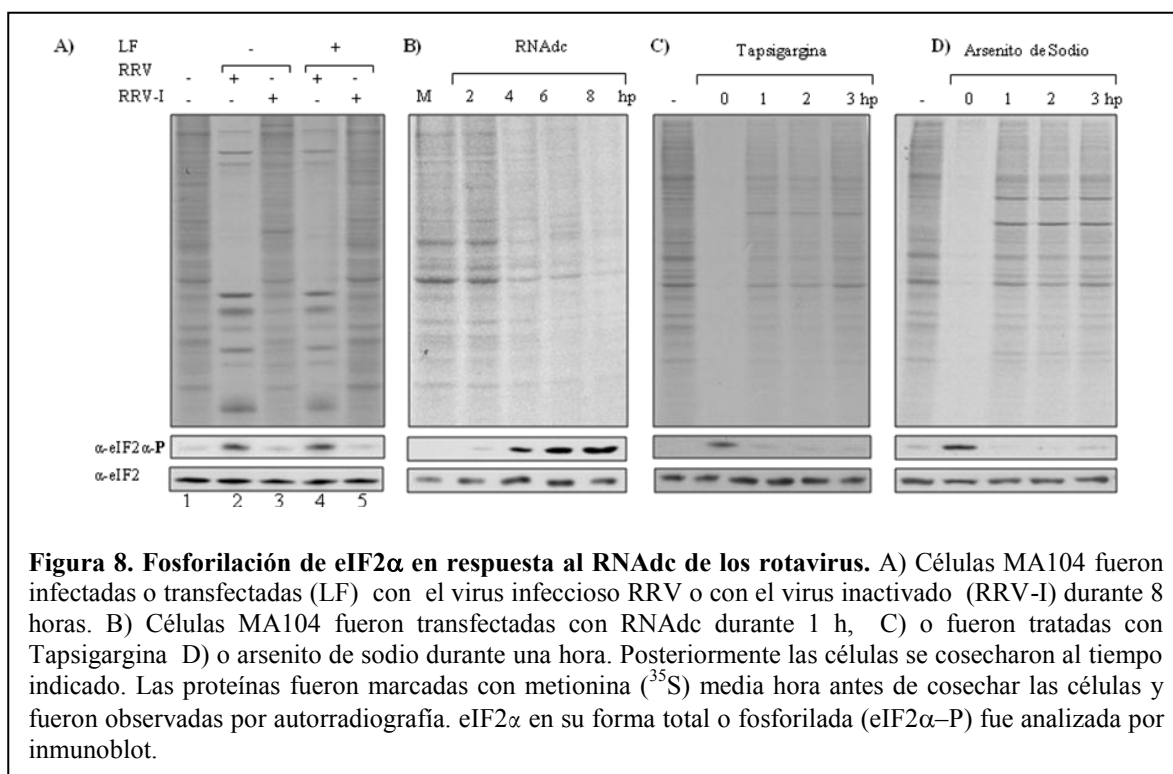


**Figura 7. Expresión de proteínas virales en células COS-7.** Células COS-7 fueron infectadas el rotavirus RRV o fueron transfectadas con los plásmidos pcDNA-VP2, pcDNA-NSP2 o pcDNA-NSP5. A) A los tiempos indicados las proteínas fueron cosechadas y analizadas por inmunoblot utilizando los anticuerpos indicados. B) Adicionalmente, las células fueron infectadas o no con el virus vaccinia. En el caso de células infectadas con el rotavirus RRV se observan las diferentes isoformas de NSP5, mientras que en células transfectadas solo se observa la isoforma de menor peso molecular. C) Células transfectadas con los plásmidos para VP2 o NSP5 fueron analizadas por inmunofluorescencia, las proteínas virales fueron detectadas utilizando los anticuerpos indicados (verde) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul)

Por otra parte, para evaluar si la entrada del virus a la célula era responsable de inducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , monocapas de células MA104 fueron infectadas con virus infeccioso o con virus inactivado (RRV-I) con psoralen y luz ultravioleta, tratamiento que genera entrecruzamiento del RNA viral y que resulta en virus que son capaces de unirse a su receptor celular y entrar en la célula hospedera, pero que son incapaces de iniciar la transcripción viral. Además, los virus infecciosos o inactivados fueron introducidos a las células por transfección con el propósito de sobrepasar el proceso de entrada del virus. Como esperábamos, la infección o la transfección de partículas virales infecciosas resultó en la síntesis de proteínas virales (Fig. 8A carriles 2 y 4) y esto correlacionó con la inducción de la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ . En contraste, la infección o transfección del virus inactivado no dio lugar a la síntesis de proteína viral y además no se indujo la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Fig. 8A, carriles 3 y 5). Estos resultados sugieren que algún componente producido durante la infección viral es requerido para inducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y permite descartar el proceso de entrada como el inductor de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .

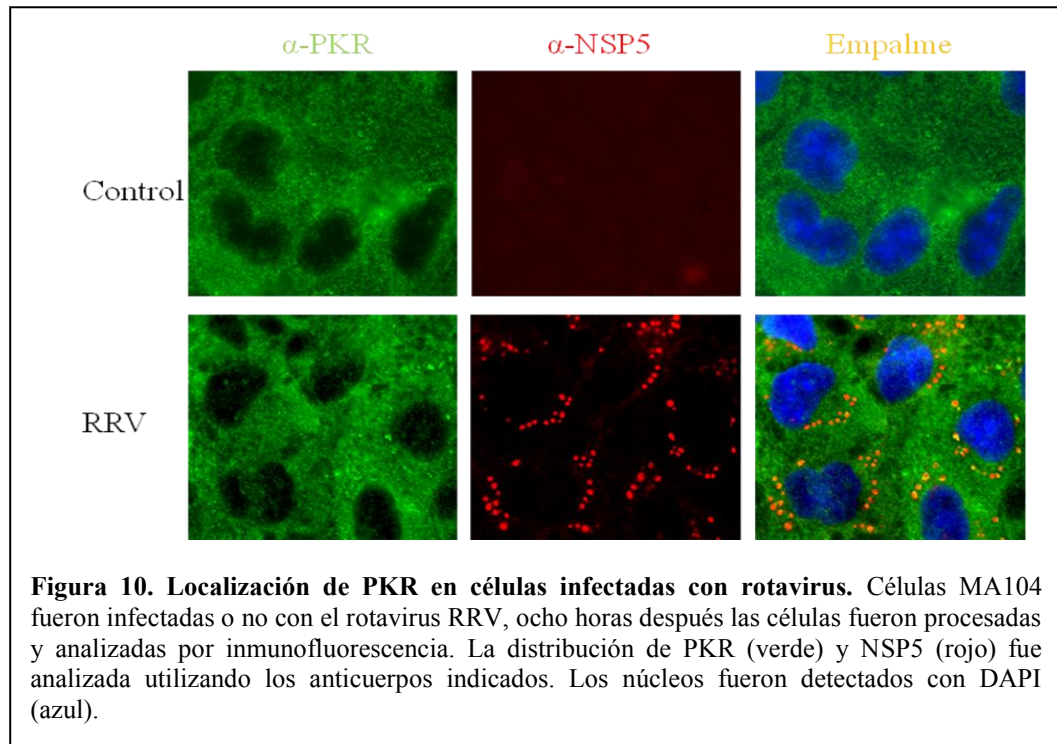
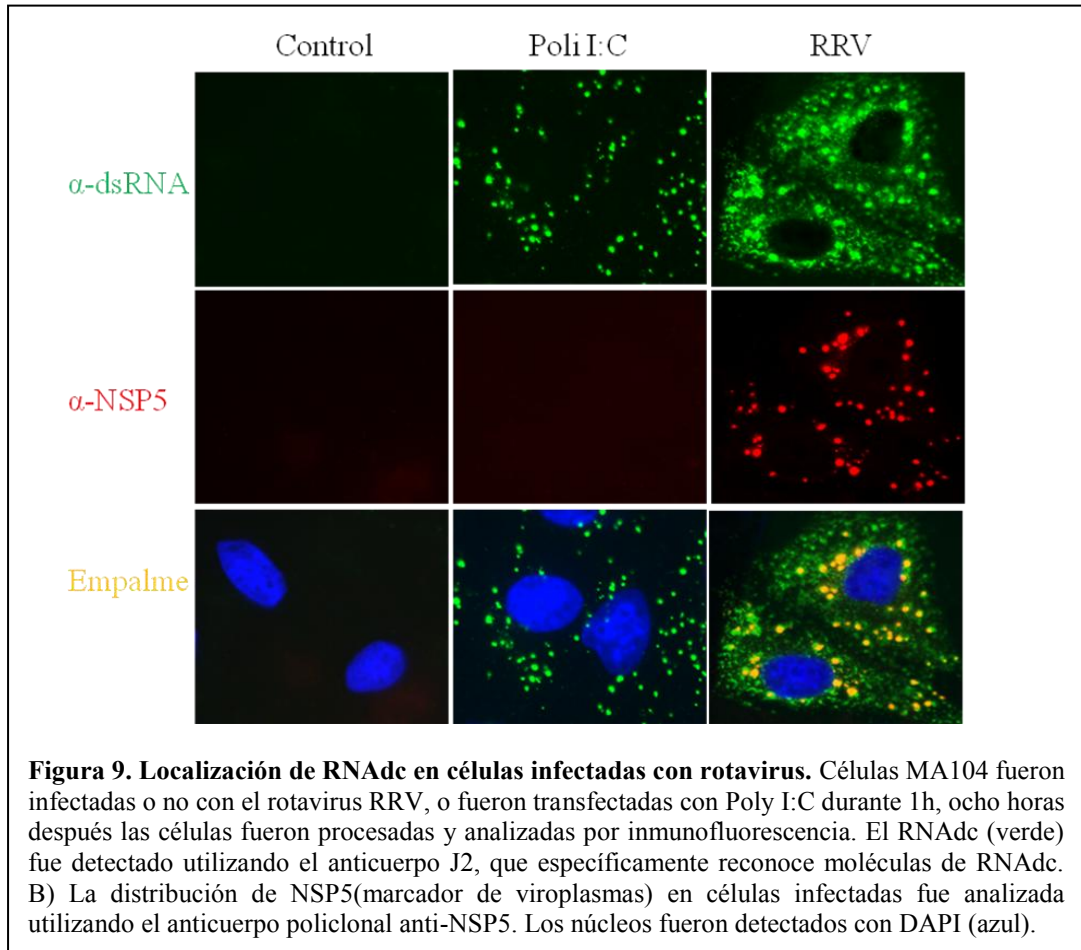
Para determinar si el RNA viral era responsable de la inducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus, monocapas de células MA104 fueron transfectadas durante 1 h con RNAdc (purificado a partir de células infectadas con rotavirus), o fueron tratadas con taspigargina o arsenito de sodio y a diferentes horas post-transfección las células fueron cosechadas y la síntesis de proteínas y la fosforilación de eIF2 $\alpha$  fueron analizadas por autorradiografía e inmunoblot, respectivamente. En este análisis encontramos que el RNAdc de los rotavirus es capaz de inducir la fosforilación de

eIF2 $\alpha$  (Fig. 8B) y esto correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. En contraste al tratamiento con tapsigargina o arsenito de sodio, que inducen la fosforilación de eIF2 $\alpha$  de forma transitoria (Fig. 8 C y D), el RNAdc indujo la fosforilación de eIF2 $\alpha$  aproximadamente a partir de las 2 horas post-transfección y ésta se mantuvo hasta las 8 horas (Fig. 8B), de una manera similar a lo que ocurre durante la infección por rotavirus (Montero *et al.*, 2008) (Anexo 1).

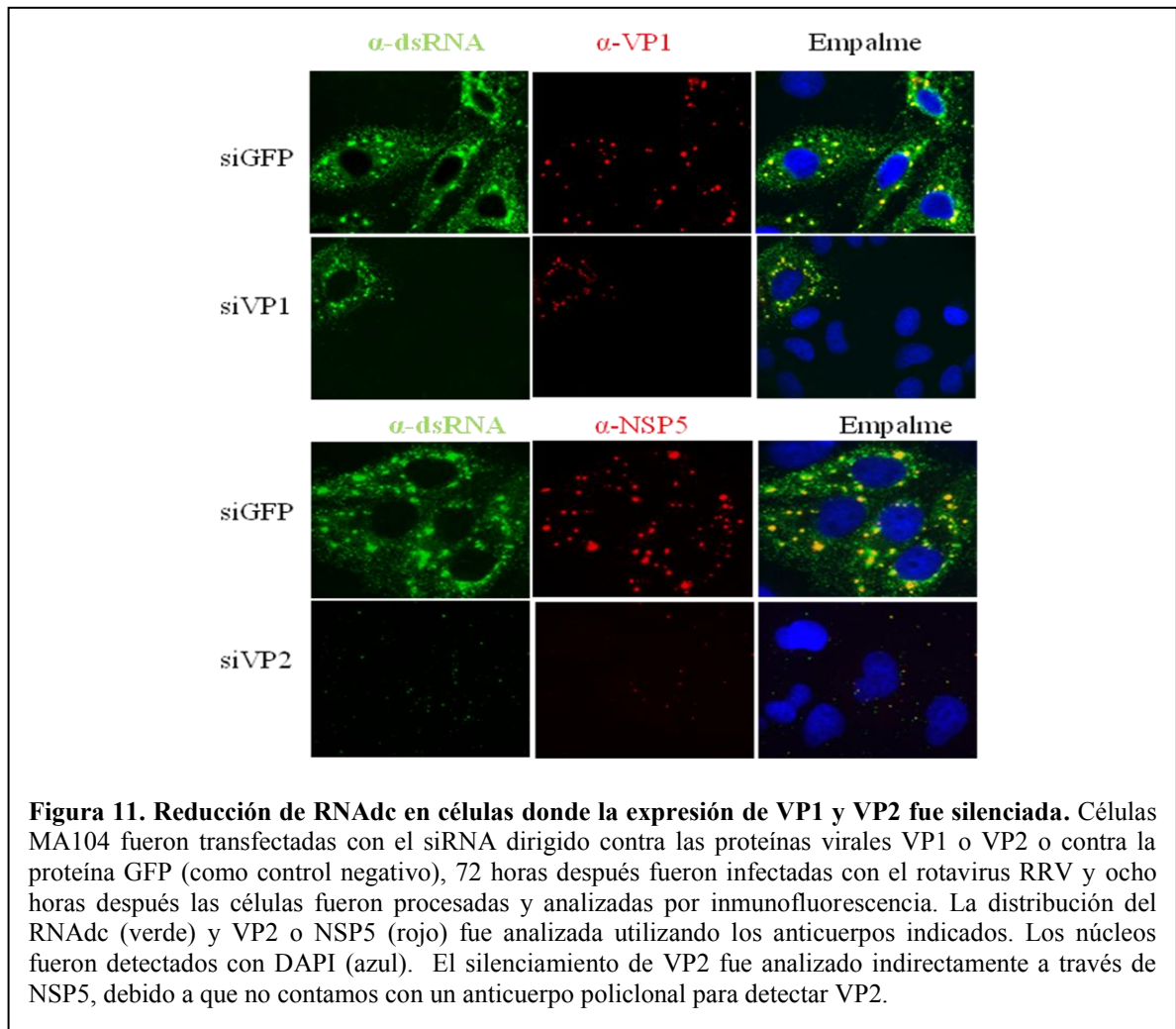


Se ha propuesto que la síntesis de RNA genómico de rotavirus se lleva a cabo al mismo tiempo que éste es empaquetado en las partículas virales, lo cual ocurre en los viroplasmos (Patton & Gallegos, 1990). Esto sugería que no hay moléculas de RNAdc en el citoplasma celular para inducir la activación de la cinasa PKR, esta propuesta también

explicaría como el virus mantiene “oculto” su genoma a la respuesta mediada por interferón. Sin embargo, nuestros resultados sugieren la presencia de moléculas de RNAdc en el citoplasma celular, las cuales probablemente inducen la activación de PKR. El origen más probable de este RNA podría ser el RNAm viral altamente estructurado con regiones de doble cadena capaces de activar a la cinasa PKR, o podría ser RNA genómico que de alguna manera se encuentra fuera de los viroplasmos. Otra alternativa, es que la cinasa PKR podría ser reclutada hasta los viroplasmos donde ocurre la replicación y detectar la presencia del RNA genómico. Para discernir entre estas posibilidades, monocapas de células MA104 fueron infectadas con rotavirus o fueron transfectadas con Poly I:C (molécula de RNAdc sintética) como control positivo y se determinó la distribución del RNAdc y PKR en las células por inmunofluorescencia. Utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RNAdc detectamos la presencia de moléculas de RNAdc en el citoplasma de células infectadas o transfectadas con Poly I:C; pero no en células no infectadas (Fig. 9). Encontramos que parte de la señal de RNAdc encontrada en células infectadas co-localiza con viroplasmos (NSP5, proteína indicadora de viroplasmos), sitio donde ocurre la síntesis del RNA genómico; sin embargo, la mayor parte de esta señal se localiza en el citoplasma al igual que la señal detectada para PKR (Fig. 10).

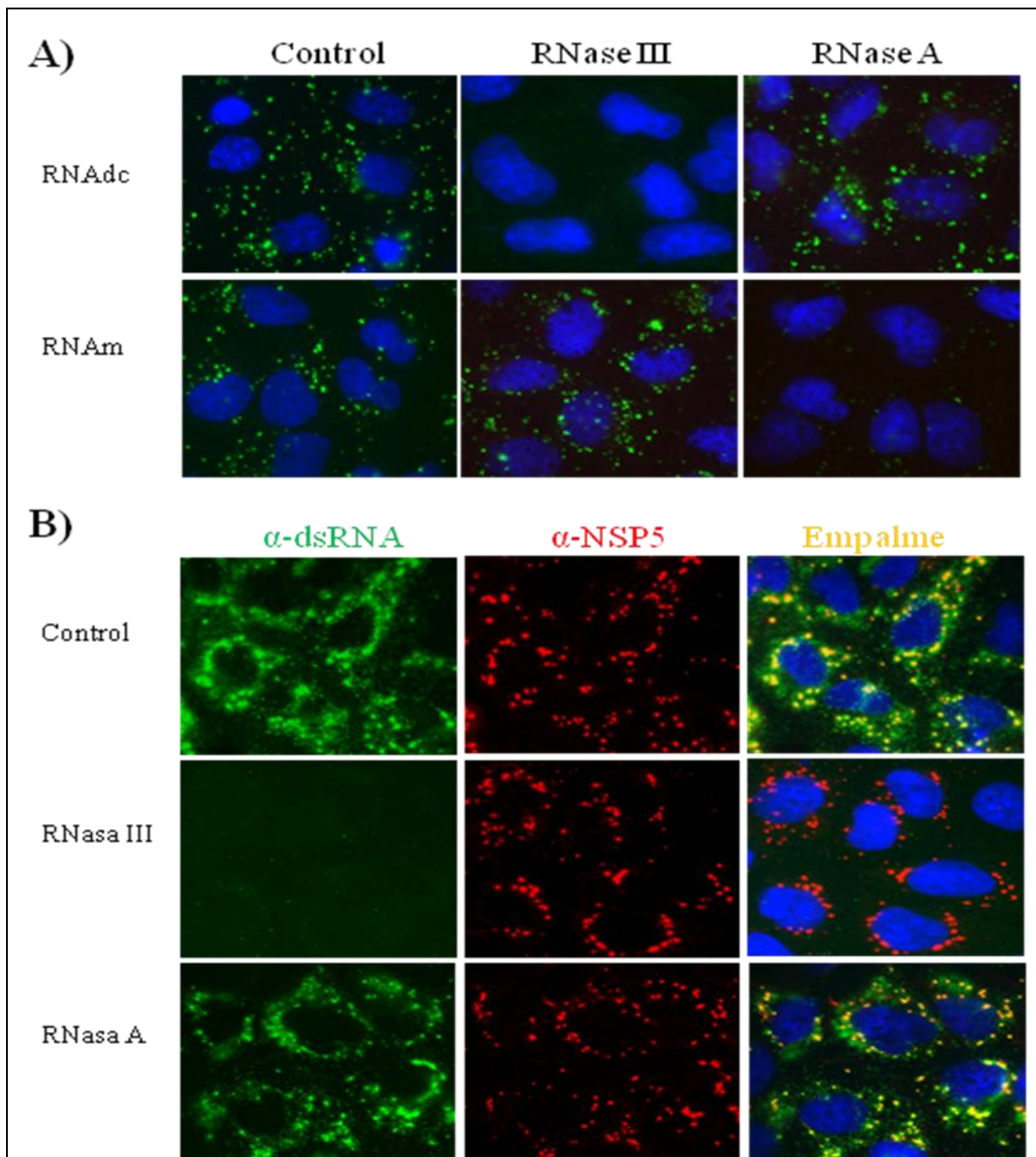


Para confirmar que el antígeno detectado por el anticuerpo anti-RNAdc era RNA viral, analizamos la presencia de RNA de doble cadena en células MA104 donde la expresión de las proteínas virales VP1 y VP2 fue silenciada. Estas condiciones fueron utilizadas ya que en nuestro laboratorio se ha demostrado que el silenciamiento de VP1 no afecta la síntesis de proteínas virales, pero resulta en la reducción de la síntesis de RNA viral, en cambio el silenciamiento de VP2 resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas y RNA viral (Ayala-Breton *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2008) (Anexo 1). Como se esperaba, en ausencia de VP1 o VP2, el antígeno detectado por el anticuerpo anti-RNAdc se redujo notablemente, confirmando que el anticuerpo anti-RNAdc está detectando moléculas de RNAdc viral (Fig. 11).

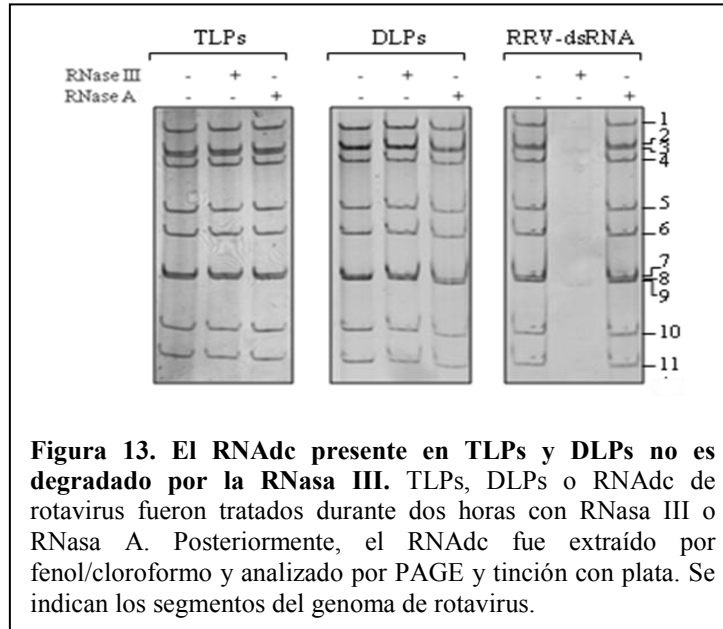




Para determinar si el RNAdc citoplásmico que no colocaliza con los viroplasmos era RNAm estructurado o RNA genómico, monocapas de células MA104 crecidas en cubreobjetos fueron infectadas o transfectadas con RNAdc o RNAm (gen 10) de rotavirus durante 1 h y ocho horas después las células se fijaron, permeabilizaron y se trataron o no con RNasa III o RNasa A, que degradan específicamente RNA de cadena doble y RNA de cadena sencilla, respectivamente. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-RNAdc. Por inmunofluorescencia encontramos que el RNAdc detectado en células infectadas con rotavirus (Fig. 12B) o células transfectadas con RNAdc (Fig. 12A) fue sensible a RNasa III, pero no a RNasa A. En cambio, el RNAm de rotavirus fue sensible a RNasa A y no a RNasa III (Fig. 12B). La RNasa III no fue capaz de degradar el RNAdc cuando está dentro de las TLPs o DLPs (Fig. 13), pero sí fue capaz de degradar el RNAdc genómico una vez que la triple capa de proteínas fue removida (Fig. 13). Estos resultados sugieren que hay una gran cantidad de RNA viral de doble cadena en el citoplasma de células infectadas, el cual no está asociado a viroplasmos ni a partículas virales, y muy probablemente estas moléculas son las responsables de inducir la activación de PKR que posteriormente fosforila a eIF2 $\alpha$ .



**Figura 12. Digestión *in situ* de RNA.** A) Células MA104 fueron transfectadas con RNA<sub>dc</sub> o RNA<sub>m</sub> (gen 10) de rotavirus durante 1h. B) Células MA104 fueron infectadas con el rotavirus RRV. Ocho horas después de la infección o transfección de RNA<sub>m</sub>, las células fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas o no con RNasa III o RNasa A. Posteriormente, las células fueron analizadas por inmunofluorescencia. El RNA<sub>dc</sub> (verde) fue detectado utilizando el anticuerpo J2, que específicamente reconoce moléculas de RNA<sub>dc</sub>. La distribución de NSP5 (rojo) en células infectadas fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5. Los núcleos fueron detectados con DAPI (azul).

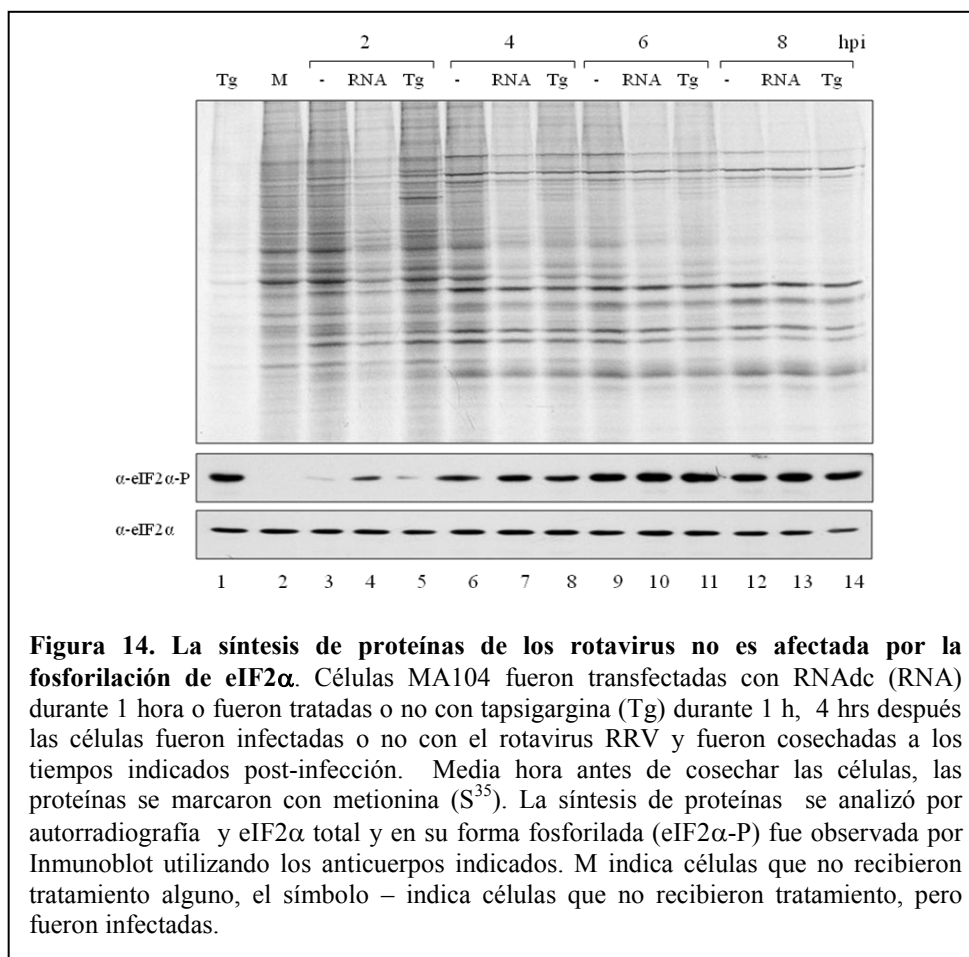


**Figura 13. El RNAdc presente en TLPs y DLPs no es degradado por la RNasa III.** TLPs, DLPs o RNAdc de rotavirus fueron tratados durante dos horas con RNasa III o RNasa A. Posteriormente, el RNAdc fue extraído por fenol/cloroformo y analizado por PAGE y tinción con plata. Se indican los segmentos del genoma de rotavirus.

### **La síntesis de proteínas de rotavirus es resistente a la fosforilación inducida por RNAdc**

Nuestros resultados muestran que la síntesis de proteínas virales no es inhibida por la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , probablemente esto se debe a que los rotavirus utilizan mecanismos que les permiten evadir el bloqueo impuesto por la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . En este mismo sentido es posible que en los primeros minutos, cuando la infección aún no se ha establecido del todo, la síntesis de proteínas virales sea vulnerable a la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Para probar esta hipótesis, monocapas de células MA104 fueron transfectadas o no con RNAdc durante 1 hora, alternativamente, las células fueron tratadas o no con tapsigargina y cuatro horas después fueron infectadas con el rotavirus RRV. Como hemos mencionado antes, el RNAdc induce la fosforilación permanente de eIF2 $\alpha$  (Fig. 8B), por lo cual esta estrategia nos permitió analizar la síntesis de proteínas virales en células donde la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y la inhibición de la síntesis de proteínas celulares fueron eventos

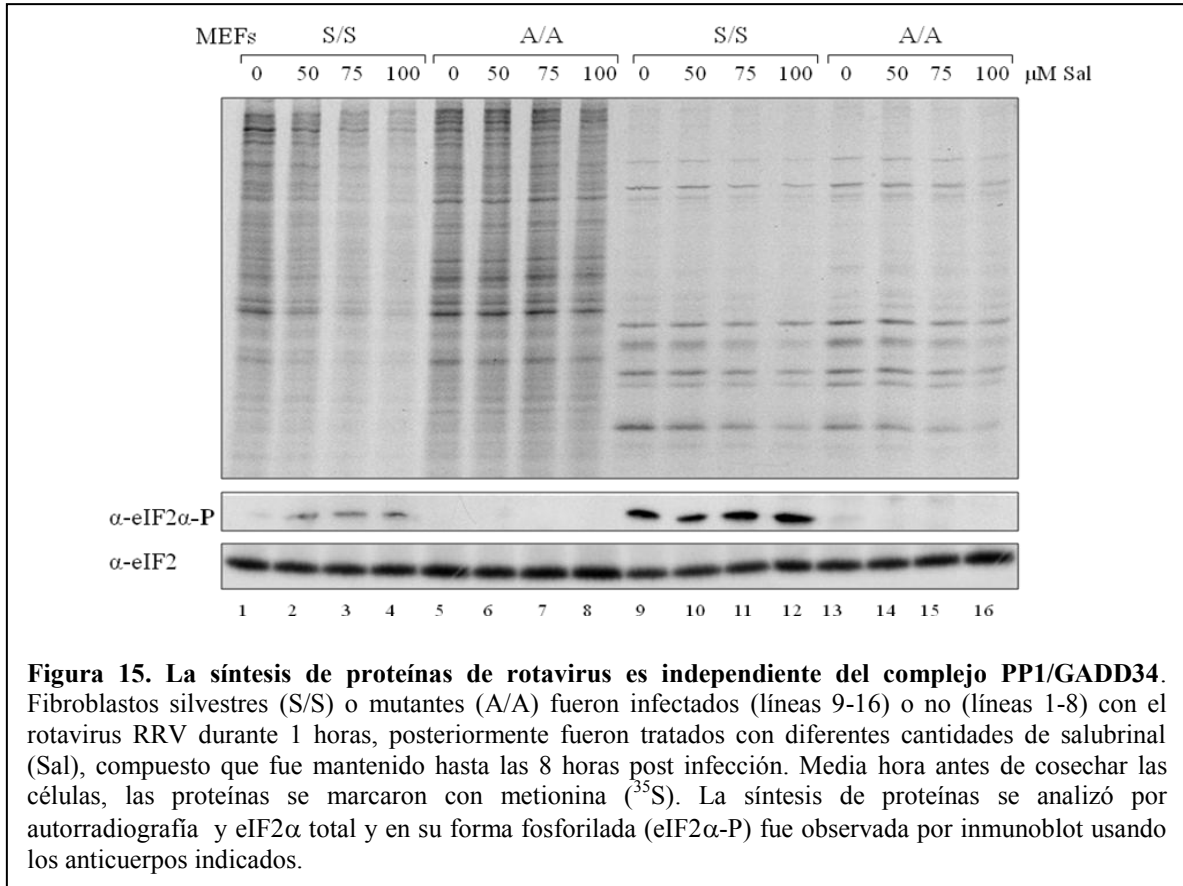
previos a la infección. Nuestros resultados demuestran que a las dos horas post infección, las células previamente transfectadas con RNAdc muestran una cantidad mayor de eIF2 $\alpha$  fosforilado que la observada en células control o tratadas con tapsigargina (Fig. 14, líneas 3-5). Además, se observa una mayor inhibición de la síntesis de proteína celular, este efecto se puede apreciar hasta las 6 horas post infección (Fig. 14). Sorprendentemente, la síntesis de proteína viral fue eficiente en todos los tiempos analizados (Fig. 14). Estos resultados indican que la síntesis de proteínas virales no es afectada en ninguna etapa por la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .



**Figura 14. La síntesis de proteínas de los rotavirus no es afectada por la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .** Células MA104 fueron transfectadas con RNAdc (RNA) durante 1 hora o fueron tratadas o no con tapsigargina (Tg) durante 1 h, 4 hrs después las células fueron infectadas o no con el rotavirus RRV y fueron cosechadas a los tiempos indicados post-infección. Media hora antes de cosechar las células, las proteínas se marcaron con metionina ( $S^{35}$ ). La síntesis de proteínas se analizó por autorradiografía y eIF2 $\alpha$  total y en su forma fosforilada (eIF2 $\alpha$ -P) fue observada por Inmunoblot utilizando los anticuerpos indicados. M indica células que no recibieron tratamiento alguno, el símbolo – indica células que no recibieron tratamiento, pero fueron infectadas.

## **La síntesis de proteínas de rotavirus es independiente del complejo PP1/GADD34**

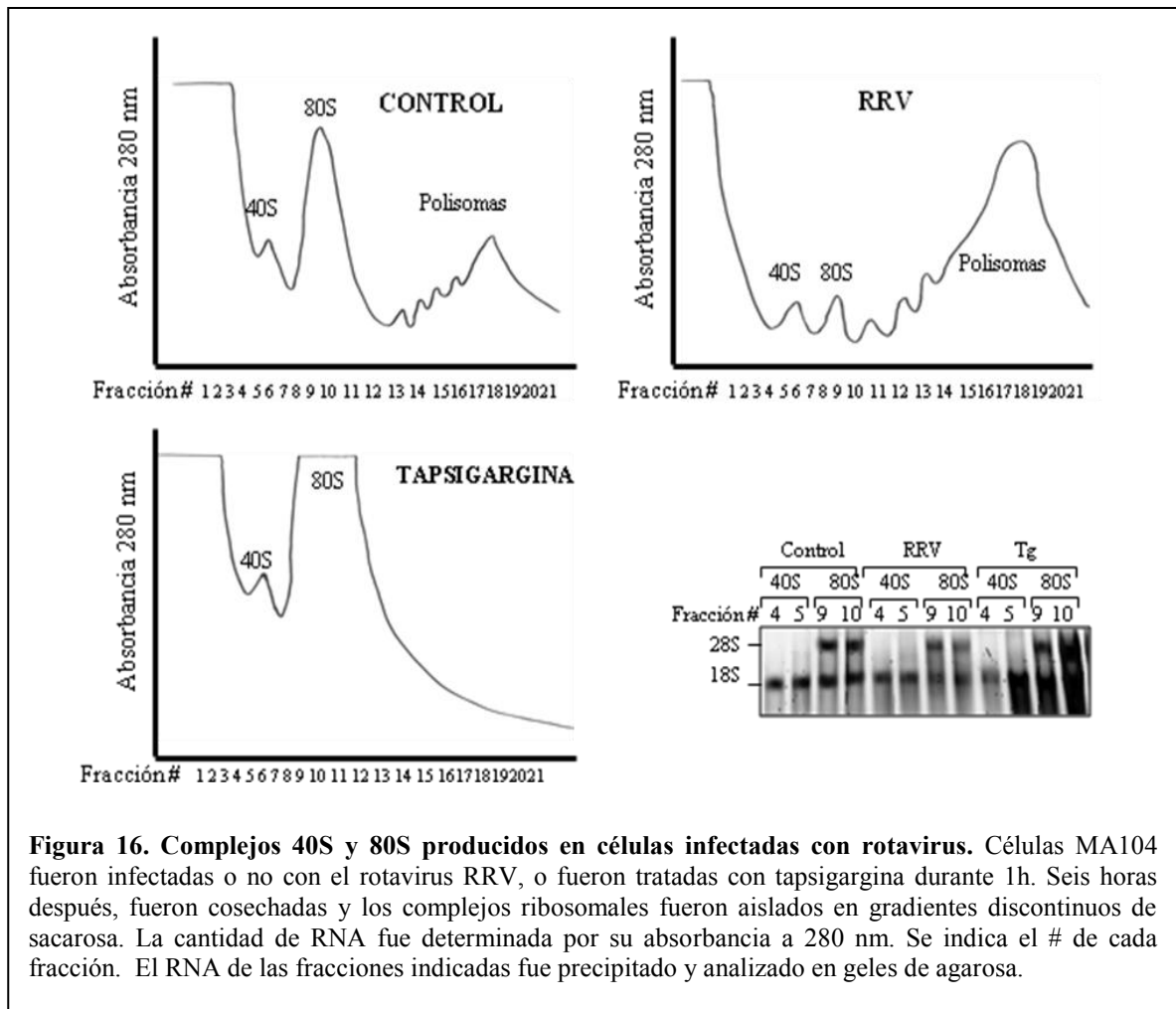
Nuestros resultados indican que los rotavirus cuentan con un mecanismo que permite la síntesis de sus proteínas aún en presencia del factor eIF2 $\alpha$  fosforilado. Una posibilidad es que estos virus estén induciendo la actividad rápida y/o localizada de PP1/GADD34, complejo que se encarga de la des-fosforilación de eIF2 $\alpha$ , y de esta forma permitir una ventana de tiempo que permita la síntesis de sus proteínas. Para analizar esta posibilidad, MEFs silvestres (S/S) o mutantes (A/A) fueron infectados o no con rotavirus y fueron tratados o no con diferentes cantidades de salubrinal, un inhibidor específico de la actividad de fosfatasa del complejo PP1/GADD34. Este compuesto indujo la acumulación de eIF2 $\alpha$  fosforilado sólo en células silvestres no infectadas y esto correlacionó con una disminución en la síntesis de proteínas celulares (Fig. 15, líneas 1-4). Previamente, se ha demostrado que el salubrinal no induce activación de las cinasas que fosforilan a eIF2 $\alpha$ , indicando que la presencia de eIF2 $\alpha$  fosforilado en respuesta al salubrinal se debe a la inactivación del complejo encargado de su des-fosforilación. Por otro lado, la síntesis de proteínas virales fue eficiente en ambos tipos celulares, aún en presencia del salubrinal (Fig. 15, líneas 9-16), sugiriendo que la de-fosforilación de eIF2 $\alpha$  por el complejo PP1/GADD34 no es requerida para la síntesis de proteínas de los rotavirus.



### Caracterización de los complejos de inicio de la traducción producidos en células infectadas por rotavirus

Cuando se induce la fosforilación del factor eIF2α como consecuencia de algún tipo de estrés queda una pequeña fracción de este factor no fosforilado; así que, durante la infección por rotavirus es posible que se logre reclutar a los complejos de inicio de la traducción 48S solo esta pequeña fracción del factor eIF2α que no ha sido fosforilado, o bien, que durante la infección por rotavirus se pueda incorporar el factor fosforilado en el complejo 48S. Otra alternativa es que durante la infección, la formación del complejo 48S no requiera la participación de eIF2α, en este caso la formación del complejo 48S podría

depender de una proteína llamada eIF2A. Al igual que eIF2 $\alpha$ , eIF2A puede unirse al tRNA<sup>met</sup> y colocarlo en el sitio P del ribosoma; sin embargo, en este caso el proceso no requiere la participación del intercambiador de nucleótido eIF2B, ni de la hidrólisis de GTP (Merrick & Anderson, 1975).



**Figura 16. Complejos 40S y 80S producidos en células infectadas con rotavirus.** Células MA104 fueron infectadas o no con el rotavirus RRV, o fueron tratadas con tpsigargina durante 1h. Seis horas después, fueron cosechadas y los complejos ribosomales fueron aislados en gradientes discontinuos de sacarosa. La cantidad de RNA fue determinada por su absorbancia a 280 nm. Se indica el # de cada fracción. El RNA de las fracciones indicadas fue precipitado y analizado en geles de agarosa.

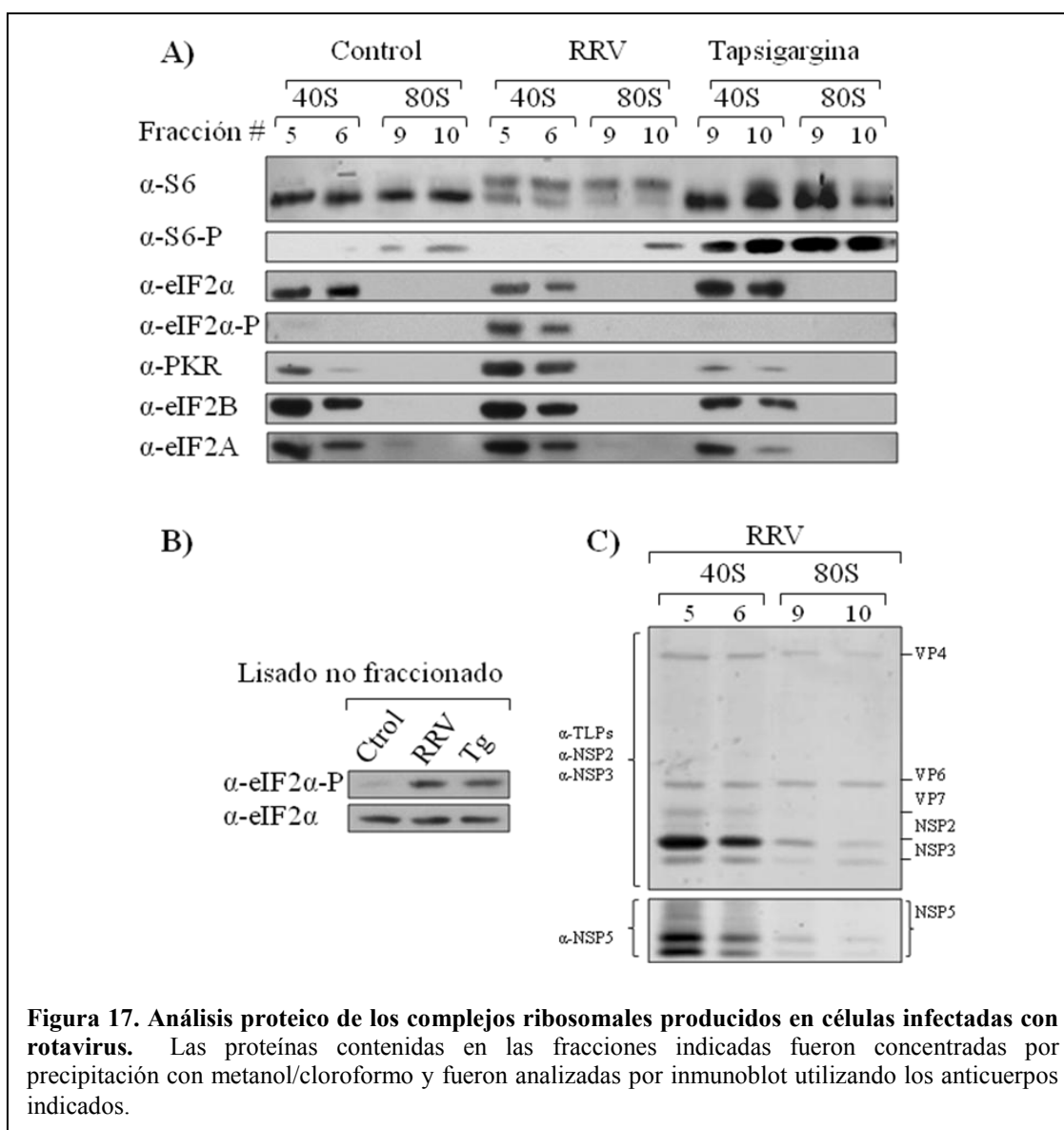
Para estudiar el proceso de formación del complejo 48S durante la infección por rotavirus, se aislaron los diferentes complejos ribosomales formados en células control, células tratadas con tpsigargina o células infectadas con rotavirus, mediante gradientes de sacarosa. Estos gradientes fueron fraccionados y se analizó la absorbancia de luz UV de

cada fracción. Con este análisis se obtuvieron perfiles que muestran diferentes picos característicos de los complejos 40S (que incluye a los complejos 43S y 48S), 80S y los polisomas (Fig.16). La presencia de los complejos 40S y 80S se confirmó mediante la extracción del RNA de las subunidades pequeña y grande del ribosoma, 18S y 28S (Fig. 16). Este análisis mostró que en células infectadas con rotavirus se observa una cantidad menor de los complejos 40S y 80S; sin embargo, la cantidad de polisomas se observó incrementada notablemente respecto al control de células infectadas (Fig. 16). Por otra parte, el tratamiento con tapsigargina resultó en la acumulación de los complejos 80S y pérdida casi total de las fracciones polisomales (Fig. 16).

Las proteínas contenidas en las fracciones 40S y 80S fueron precipitadas y analizadas por inmunoblot. Como control se detectó a la proteína de la subunidad pequeña del ribosoma S6 que fue observada en las fracciones 40S y 80S de las tres condiciones (Fig. 17A). En el caso de células infectadas, esta proteína mostró un patrón de migración diferente al control y este cambio no se debe a la fosforilación de esta proteína, de hecho la fosforilación de S6 es escasa en células infectadas (Fig. 17A). Estos resultados indican que la proteína pequeña ribosomal S6 es modificada en respuesta a la infección por los rotavirus. Tal como se ha descrito antes (Robert *et al.*, 2006), en las fracciones 40S pero no en las 80S logramos detectar al factor eIF2 $\alpha$ ; sin embargo, en el caso de células infectadas este factor está fosforilado (Fig. 17A). A pesar de que en células tratadas con tapsigargina también se induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Fig. 17B), el factor fosforilado no se encuentra en las fracciones 40S (Fig. 17A). Interesantemente, observamos que en las fracciones 40S de células infectadas se encuentra una mayor cantidad de la cinasa PKR, confirmando una vez más que esta es la cinasa involucrada en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en células infectadas



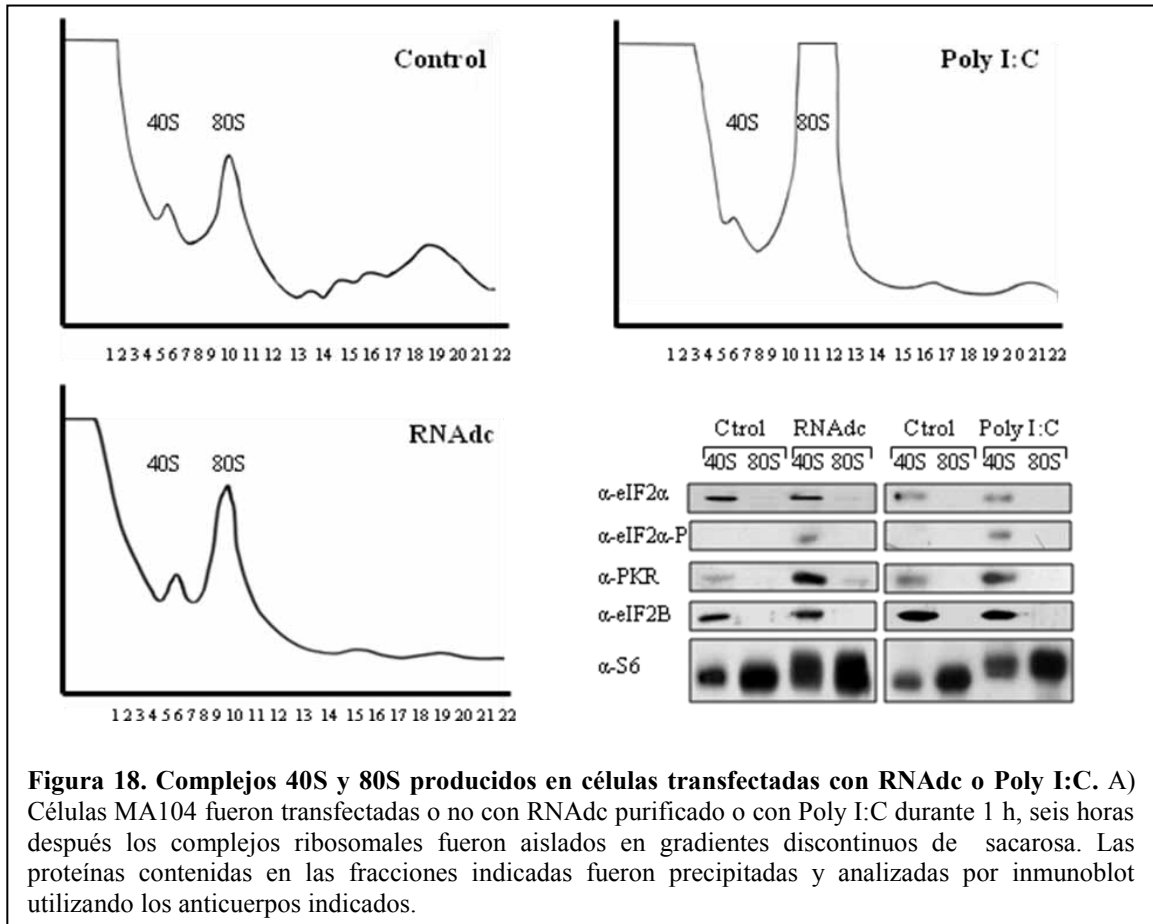
con rotavirus (Fig. 17A). La presencia de los factores de inicio de la traducción eIF2B $\epsilon$  y eIF2A también fue detectada en las fracciones 40S; sin embargo, no se apreciaron diferencias entre las diferentes condiciones analizadas (Fig. 17A). Las fracciones 40S y 80S de células infectadas también fueron analizadas para detectar la presencia de proteínas virales, en estas fracciones se detectaron varias proteínas virales observando un particular enriquecimiento de la proteínas NSP2 y NSP5. En conjunto, estos resultados sugieren que durante la infección por rotavirus la maquinaria de traducción celular es modificada.



**Figura 17. Análisis proteico de los complejos ribosomales producidos en células infectadas con rotavirus.** Las proteínas contenidas en las fracciones indicadas fueron concentradas por precipitación con metanol/cloroformo y fueron analizadas por inmunoblot utilizando los anticuerpos indicados.

## **Cambios en la composición de los complejos de traducción en respuesta al RNAdc**

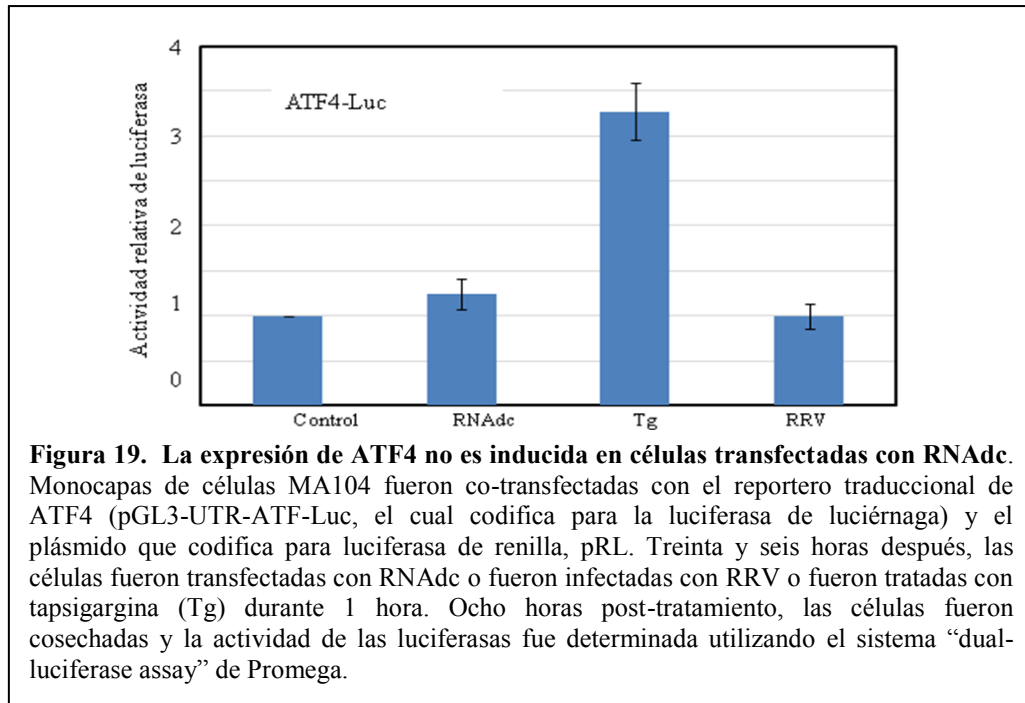
Nuestros resultados sugieren que la maquinaria de traducción celular es remodelada en células infectadas con rotavirus, y esto podría ser inducido específicamente por el virus o bien podría ser parte de la respuesta celular antiviral inducida por la presencia de RNAdc. Para discernir entre estas posibilidades, monocapas de células MA104 fueron transfectadas con RNAdc o Poly I:C y seis horas después los complejos de traducción fueron purificados por gradientes de sacarosa y se obtuvieron los perfiles correspondientes (Fig. 18). Al igual que en células tratadas con tapsigargina (Fig. 16), el RNAdc y el Poly I:C condujeron al incremento en la acumulación de los complejos 80S y a la reducción en la acumulación de las fracciones polisomales (Fig. 18). Pero a diferencia de tapsigargina, la transfección de RNAdc o Poly I:C indujo la acumulación del factor eIF2 $\alpha$  fosforilado y PKR en las fracciones 40S, además de un cambio en la migración de la proteína S6 (Fig.18). Estos resultados son similares a los observados en células infectadas con rotavirus y sugieren que los cambios observados en las fracciones ribosomales 40S pueden ser inducidos por RNAdc, lo que además sugiere que estos cambios forman parte de la respuesta antiviral de la célula y no son inducidos específicamente por los rotavirus



### La expresión de ATF4 no es estimulada en células transfectadas con RNAdc

La fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  representa un punto clave en el que algunas vías de señalización celular convergen. Una de ellas es la llamada respuesta a estrés de retículo endoplásmico (UPR, por sus siglas en ingles unfolded protein response) (Bernal *et al.*, 2006; Novoa *et al.*, 2003). En nuestro laboratorio se ha encontrado que durante la infección por rotavirus, la proteína viral NSP3 regula negativamente la expresión de las proteínas que responden al estrés en retículo endoplásmico, GRP78, GRP4 y CHOP. Otra proteína de UPR es ATF4, cuya expresión se ve estimulada por la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Vattem & Wek, 2004). Interesantemente, durante la infección por rotavirus, la expresión de ATF4 no

es estimulada, a pesar de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y este efecto no está relacionado con NSP3 (Trujillo-Alonso *et al*, datos no publicados). Para probar si este fenotipo también se podía mimetizar en células transfectadas con RNAdc de rotavirus, monocapas de células MA104 fueron transfectadas con un reportero traduccional de ATF4 (pGL3-UTR-ATF4-Luc), el cual contiene la región 5' no traducida de ATF4 seguida por la región codificante de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor constitutivo de la cinasa timidina. Este reportero, fue co-transfectado con un plásmido que codifica para la luciferasa de renilla, lo cual sirve para normalizar los resultados. Después de transfectar las células con los plásmidos mencionados se infectaron con el rotavirus RRV o se transfectaron con el RNAdc o se trataron con taspigargina, como control positivo de la inducción de ATF4. Posteriormente, las células fueron cosechadas y la actividad de la luciferasa de luciérnaga fue determinada y normalizada contra la actividad de luciferasa de renilla. Como se ha reportado (Vattem & Wek, 2004), encontramos que la expresión de ATF4 es estimulada en respuesta a la fosforilación de eIF2 $\alpha$  inducida por taspigargina, y como se ha determinado en nuestro laboratorio (Trujillo-Alonso, *et al* datos no publicados) encontramos que su expresión no es inducida en células infectadas con rotavirus y este fenotipo fue reproducido en células que fueron transfectadas con RNAdc (Fig. 19). Estos resultados sugieren que la falta de inducción de la expresión de ATF4 observada en células infectadas con rotavirus es mimetizada en células transfectadas con RNAdc, a pesar de que en estas condiciones el factor eIF2 $\alpha$  se encuentra fosforilado.

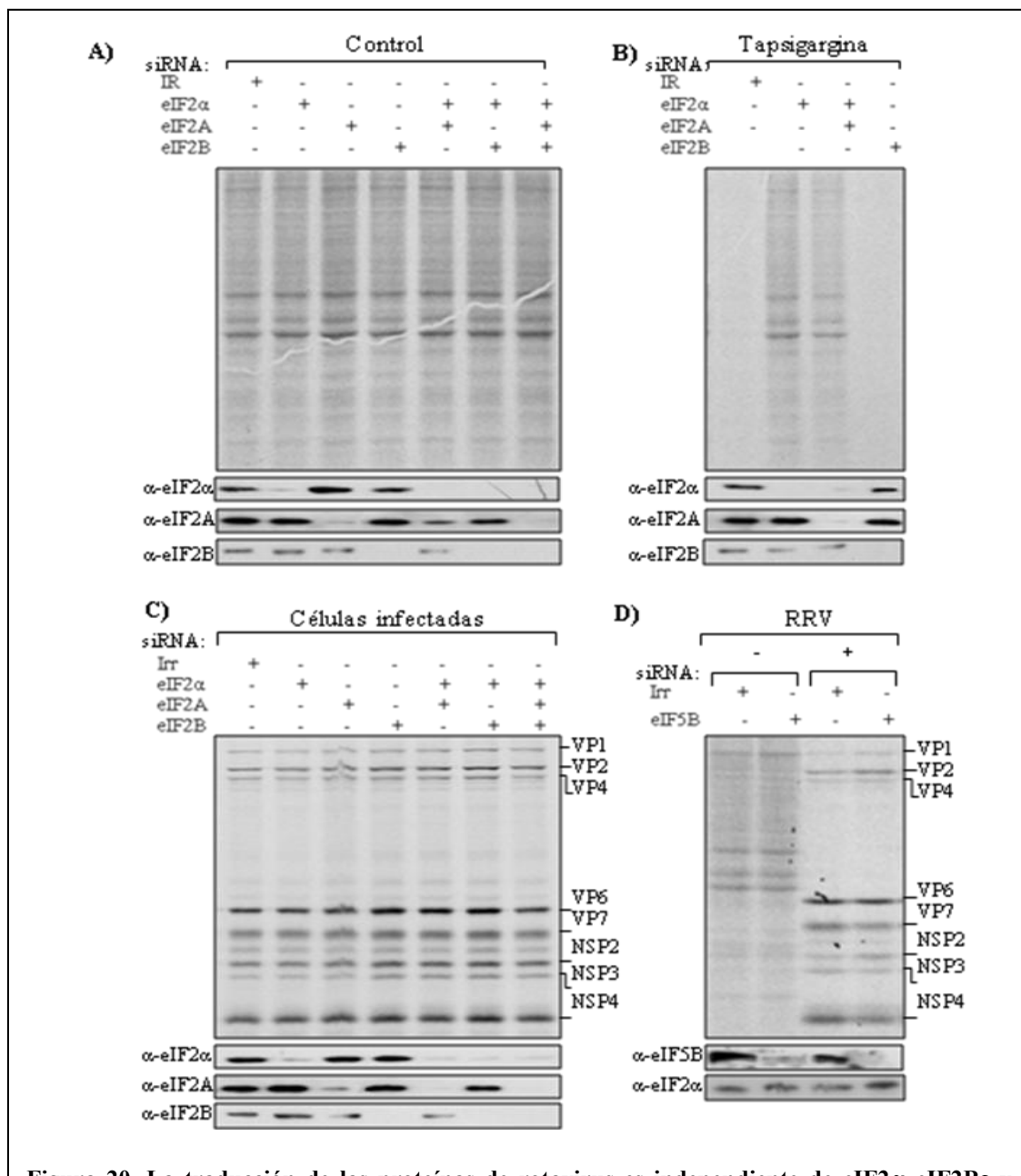


## La traducción de las proteínas de rotavirus es independiente de los factores de inicio eIF2 $\alpha$ , eIFB $\epsilon$ , eIF2A y eIF5B

Varias líneas de investigación han demostrado que la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  evita la formación del complejo ternario, lo cual conduce a la inhibición del inicio de la síntesis de proteínas. Sin embargo, también se han sugerido algunos mecanismos para sobrepasar la inhibición de la síntesis de proteínas causada por la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Uno de estos mecanismos involucra la participación del factor intercambiador de nucleótido, eIF2B. Este factor está compuesto de cinco subunidades, de las cuales la  $\epsilon$  y la  $\gamma$  funcionan como complejo catalítico y las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  como complejo sensor de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Proud, 2005). Se ha reportado que algunas mutaciones puntuales

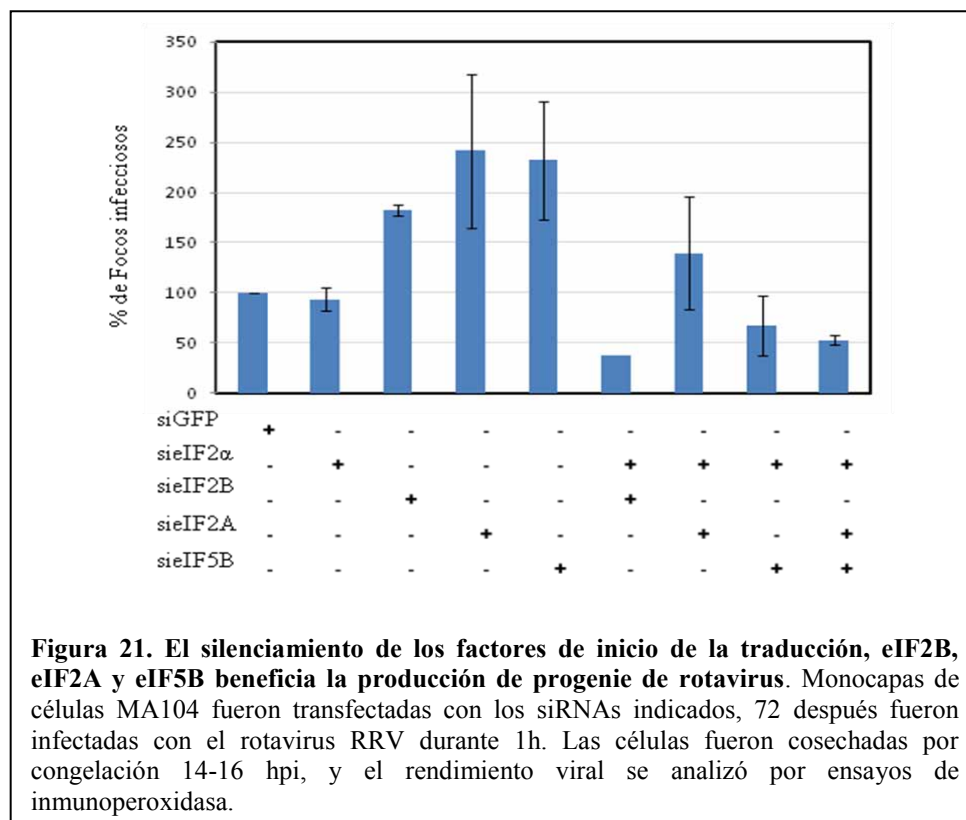
en el complejo sensor permiten el intercambio de nucleótido de eIF2 $\alpha$  aún cuando este factor esta fosforilado (Vazquez de Aldana & Hinnebusch, 1994). También se ha reportado que la desregulación de la formación del complejo eIF2B permite dicho intercambio (Balachandran & Barber, 2004). De modo que durante la infección por rotavirus, el complejo eIF2B podría ser modificado para permitir la síntesis de proteínas de rotavirus aún en presencia de eIF2 $\alpha$  fosforilado, o bien el inicio de la traducción de las proteínas de rotavirus podría depender de otra proteína celular o viral. Para evaluar esta hipótesis silenciamos la expresión individual o combinada de los factores eIF2 $\alpha$ , eIF2B $\epsilon$  y eIF2A en células MA104 y posteriormente las células fueron infectadas o no con el rotavirus RRV. Inesperadamente, encontramos que la disminución de la expresión de estos factores no afecta la síntesis de las proteínas celulares (Fig. 20A) ni de las proteínas de rotavirus (Fig. 20C). Recientemente, se ha encontrado que cuando eIF2 $\alpha$  es inactivado por su fosforilación, se puede inducir otro mecanismo de traducción similar al de bacterias. Al parecer, este mecanismo solo depende de los factores eIF3 y eIF5B. Para determinar si la traducción de proteínas de rotavirus dependía de eIF5B, esta proteína fue silenciada y en estas condiciones analizamos la expresión de proteínas de rotavirus. Interesantemente, la reducción de este factor tampoco afecto la síntesis de proteínas celulares ni virales (Fig. 20D). A pesar de no tener efecto aparente en la síntesis de proteínas de rotavirus, el silenciamiento de las proteínas eIF2B, eIF2A y eIF5B resulta en una mayor producción de progenie viral, interesantemente este efecto fue inhibido cuando la expresión de estos factores fue inhibida en combinación con eIF2 $\alpha$  (Fig. 21), sugiriendo que las proteínas eIF2B, eIF2A y eIF5B podrían tener un efecto en la replicación viral, o bien que estas

proteínas podrían ser importantes para la síntesis de alguna proteína celular con actividad antiviral.



**Figura 20. La traducción de las proteínas de rotavirus es independiente de eIF2α eIF2Bε y eIF2A.** Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs para eIF2α (2α), eIF2Bε (2B), eIF2A (2A) o con el siGFP, 72 h después las células se infectaron o no con el rotavirus RRV durante 8 horas, alternativamente las células fueron tratadas con tapsigargina durante 1h. Media hora antes de cosechar las células, las proteínas se marcaron con metionina (<sup>35</sup>S). La síntesis de proteína total se analizó por autorradiografía y los factores eIF2α, eIF2Bε, eIF2A fueron observados por inmunoblot.

En estos ensayos de silenciamiento, las células también fueron tratadas con tapsigargina (Fig. 20B). En este caso, encontramos que en células transfectadas con un siRNA irrelevante o con el siRNA para eIF2B $\epsilon$ , el tratamiento con tapsigargina resultó en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y en la inhibición de la síntesis de proteína celular (Fig. 20B). Este efecto no fue observado en células donde el factor eIF2 $\alpha$  fue silenciado (Fig. 20B), sugiriendo que en estas células el mecanismo de traducción no depende de exclusivamente de eIF2 $\alpha$ . Estos resultados sugieren que muy posiblemente existen mecanismos alternativos para el inicio de la traducción, que pueden ser utilizados para la síntesis de proteínas celulares y virales; aparentemente estos posibles mecanismos no son sensibles al estrés producido por tapsigargina.





## Discusión

El inicio de la síntesis de proteínas es un proceso finamente regulado; el factor eIF2 $\alpha$  juega un papel clave en dicha regulación. En respuesta a diversos tipos de estrés como la acumulación de proteínas mal plegadas, el choque térmico o las infecciones virales este factor es fosforilado, lo cual resulta en la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas. Debido a esto, varios virus han desarrollado diversas estrategias encaminadas a reducir la acumulación eIF2 $\alpha$  en su estado fosforilado. Por ejemplo, los adenovirus y el virus vaccinia poseen mecanismos que inactivan a las cinasas que fosforilan a eIF2 $\alpha$  (Romano *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1985), en cambio otros virus como los herpes virus tipo 1 y coronavirus estimulan la des-fosforilación de eIF2 $\alpha$  (He *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009).

En este trabajo demostramos que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  puede ser inducida por cepas de rotavirus de distintos orígenes (Fig. 4), en estas condiciones la síntesis de proteínas celulares es reducida, pero la síntesis de proteínas virales es muy eficiente. Cada una de las cepas analizadas indujo la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en diferente grado; no obstante, esto no correlacionó con la capacidad del virus para inhibir la síntesis de proteínas celulares (Fig. 4). Encontramos que la fosforilación de este factor no es indispensable para el ciclo replicativo de rotavirus, ya que estos virus infectan exitosamente células que expresan una versión de eIF2 $\alpha$  que no se fosforila (Fig. 5). Sin embargo, junto con NSP3 la fosforilación de eIF2 $\alpha$  contribuye en el apagamiento de la expresión de proteínas celulares durante la infección viral (Fig. 5). Los resultados obtenidos también sugieren que no se requiere del

apagamiento de la expresión de proteínas celulares para la infección por los rotavirus, al menos en células en cultivo (Fig. 5A, carril 5). Una posibilidad es que la inhibición de la síntesis de proteínas celulares sea importante para evitar la síntesis de alguna o algunas proteínas con actividad relacionada con la respuesta antiviral, lo cual sería de suma importancia en el caso de infecciones *in vivo*.

En células de mamífero, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  puede ser mediada por cuatro diferentes cinasas, las cuales responden a diferentes estímulos. Utilizando células que carecen de la actividad cinasa de PKR o al reducir la expresión de esta cinasa, encontramos que PKR es la cinasa responsable de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  durante la infección por rotavirus, mientras que la cinasa PERK no juega un papel importante en esta fosforilación (Fig. 6). Las cinasas PKR y PERK no parecen influir en la síntesis de proteínas virales, sin embargo, estas cinasas parecen tener cierto efecto negativo en la infección viral, ya que en su ausencia, la producción de progenie viral es mejor (Fig. 6D). El papel negativo de PKR en la replicación de rotavirus podría estar relacionado con la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , idea apoyada por el hecho que en células donde el factor eIF2 $\alpha$  no se fosforila, la progenie viral también se incrementa (Fig. 5C). Por otro lado, el efecto negativo de PERK sobre la replicación viral parece ser independiente de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , resultados similares han sido encontrados en el caso de las infecciones por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Krishnamoorthy *et al.*, 2008)

La activación de la cinasa PKR durante la infección por rotavirus puede ser inducida por diferentes factores o eventos virales. El proceso de entrada es el primer paso que podría

inducir la activación de esta cinasa; no obstante, la infección de células con partículas virales inactivadas no dio lugar a la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Fig. 8A). Debido a que estas partículas inactivadas son capaces de penetrar la membrana y alcanzar el citoplasma celular, pero no pueden iniciar la transcripción del RNAm viral, nuestros resultados descartan el proceso de entrada como inductor de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Además, estos resultados sugieren que existe un componente viral que es producido durante el ciclo replicativo el cual dispara la activación de PKR. Al parecer ese componente es el RNA genómico de rotavirus, ya que la transfección de RNAdc de rotavirus en la célula resulta en la fosforilación estable de eIF2 $\alpha$  (Fig. 8B). Además, detectamos la presencia de RNA genómico fuera de los viroplasma en células infectadas. Potencialmente, estas moléculas de RNAdc son las responsables de la activación de PKR que luego fosforila al factor eIF2 $\alpha$ ; sin embargo, desconocemos el papel de estas moléculas fuera de los sitios de replicación. Por muchos años se ha pensado que los rotavirus debían mantener oculto su genoma para no ser detectado por proteínas antivirales, particularmente, PKR y la RNasa L cuya activación estimula respuestas antivirales como la mediada por interferón y que comúnmente terminan en la apoptosis. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que estos virus utilizan mecanismos que les permiten evadir la respuesta antiviral inducida por RNAdc, prueba de esto es que el RNAdc de rotavirus puede ser encontrado fuera de los viroplasma, y que se lleva a cabo la fosforilación de eIF2 $\alpha$  mediada por PKR. A pesar de los resultados obtenidos, no podemos descartar el papel de alguna o algunas proteínas virales en la inducción y/o regulación de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , ya que encontramos que al silenciar la expresión de las proteínas virales VP1 y VP3 (que resulta en una reducción significativa del RNA viral) se mantiene la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Ayala-Breton *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2008). En conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación de

eIF2 $\alpha$  no solo está relacionada con la cantidad de RNA viral presente en la célula sino que además las proteínas virales podrían contribuir en la regulación de esta fosforilación, o bien que aún pequeñas cantidades de RNA viral, como las encontradas al silenciar VP1 y VP3, son suficientes para inducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .

Las proteínas de los rotavirus se traducen eficientemente aún cuando eIF2 $\alpha$  esta fosforilado, sin importar si esta fosforilación se lleva a cabo antes o durante la infección viral (Fig. 14). Estos resultados sugieren que los rotavirus utilizan un mecanismo traduccional que les permite evadir la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . En este trabajo hemos observado que el mecanismo que utilizan los rotavirus para la síntesis de sus proteínas no depende de la actividad fosfatasa del complejo PP1/GADD34 (Fig. 15), o de los factores eIF2 $\alpha$ , eIF2B, eIF5B, ni eIF2A (Fig. 18 C y D). Sin embargo, también hemos observado que en ausencia de estos factores la síntesis de proteínas celulares tampoco es afectada (Fig. 20 A y D), indicando que el mecanismo que utilizan los rotavirus para la traducción de sus RNAm también podría ser utilizado por las células en condiciones donde alguno de los factores canónicos de traducción está ausente. Estos resultados son interesantes, particularmente para el caso de eIF2 $\alpha$ , un factor clave en el inicio de la traducción. En numerosos trabajos y en este mismo se ha demostrado que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas remarcando su importancia como punto de regulación de la traducción. Debido a esto, nuestra primera hipótesis fue que las células no sobrevivirían a la ausencia de eIF2 $\alpha$ , para nuestra sorpresa, las células sobrevivieron y fueron capaces de sintetizar proteínas. Una explicación a estos resultados era que pequeñas cantidades de eIF2 $\alpha$ , no detectadas por inmunoblot, fueran suficientes para la síntesis de

proteínas. Otra posibilidad es la existencia de un mecanismo alternativo de traducción que no depende de eIF2 $\alpha$ , esta alternativa es apoyada por el hecho de que las células donde eIF2 $\alpha$  está ausente, la síntesis de proteínas es exitosa. Estos resultados sugieren que podrían existir factores alternativos a eIF2 $\alpha$  que promueven el inicio de la traducción (Fig. 20B).

Los virus conocidos hasta ahora inducen diversos cambios en su célula hospedera con el objetivo de generar un ambiente óptimo que les permita el establecimiento de su ciclo replicativo. Las células infectadas responden iniciando la activación de numerosas cascadas de señalización encaminadas a eliminar al virus. En este proyecto, hemos encontrado que en células infectadas con rotavirus, la composición de los complejos 40S es diferente a la encontrada en células no infectadas (Fig. 16 y 17). Entre los cambios encontrados destacan, la presencia de eIF2 $\alpha$  en su forma fosforilada y la acumulación de la cinasa PKR en los complejos 40S (Fig. 17). Sin embargo, estos cambios también son obtenidos al transfectar células MA104 con RNAdc purificado o con Poly I:C (Fig. 18), sugiriendo que la presencia de eIF2 $\alpha$  fosforilado y de la cinasa PKR en los complejos 40S no es inducida específicamente por los rotavirus. Estos cambios parecen formar parte de la respuesta que las células montan en contra de la infección viral y que los rotavirus pueden evadir al menos en células en cultivo.

En conclusión, nuestros resultados indican que durante la infección por rotavirus, una gran cantidad de RNA genómico se encuentra fuera de los viroplasmos, al parecer estas moléculas son las responsables de inducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$  mediada por PKR. El RNAdc genómico induce cambios en la composición de los complejos 40S, probablemente

encaminados a inhibir la síntesis de proteínas. Los rotavirus, son inmunes a los cambios inducidos por el RNAdc, ya que sus RNAm son eficientemente traducidos en estas condiciones, aunque el mecanismo que utilizan permanece en estudio. Estos resultados han sido aceptados para su publicación en el Journal of Virology (Anexo 2).

## **Perspectivas**

Los resultados obtenidos en este proyecto indican que el inicio de la síntesis de proteínas de rotavirus es independiente del factor eIF2 $\alpha$ , sugiriendo que otras proteínas celulares y/o virales podrían estar regulando el mecanismo de traducción que estos virus utilizan. Como primer acercamiento para caracterizar este mecanismo se propone determinar, por proteómica y espectrometría de masas, la composición proteica de los diferentes complejos de inicio de la traducción. Posteriormente, la expresión de las proteínas identificadas podría silenciarse en el contexto de la infección de rotavirus y así determinar su papel en la síntesis de proteínas de este virus. Alternativamente, se propone utilizar RNAm con características similares a los RNAm de rotavirus, estas moléculas podrían incubarse con extractos de células infectadas o no, o con extractos de reticulocitos. Posteriormente, los RNAm se pueden purificar y las proteínas que se unieron a estas moléculas se podrían analizar por inmunoblot y/o proteómica. Si se identifican proteínas celulares importantes para la traducción de los RNAm de rotavirus, después se podría identificar las regiones en los RNAm de rotavirus importantes para su interacción con proteínas celulares.

Silenciando la expresión de eIF2A, eIF2B y eIF5B hemos encontrado que estas proteínas no tienen un papel importante en la síntesis de proteínas de rotavirus; sin embargo, en su ausencia la progenie viral se incrementa notablemente, por lo cual sería interesante determinar si estas proteínas influyen en la replicación del virus y/o morfogénesis viral, o si estas proteínas son importantes en la traducción de alguna proteína celular con actividad antiviral.

En este trabajo hemos encontrado que gran parte del RNAdc de los rotavirus se encuentra en el citoplasma de las células infectadas, esto correlaciona con la activación de PKR y con la consecuentemente fosforilación de eIF2 $\alpha$ . En estas condiciones se esperaría que otras proteínas celulares como la RNasa L, que responden a la presencia de RNAdc, se encontraran activadas durante la infección. Sin embargo, contamos con estudios preliminares que indican que los rotavirus inhiben la degradación de los RNA ribosomales, evento asociado a la activación de la RNasa L, sugiriendo que la actividad de esta RNasa se encuentra inhibida durante la infección por este virus. Con base en estos antecedentes se propone determinar si la función de la RNasa L es inhibida durante la infección por rotavirus; en caso afirmativo se propone determinar el mecanismo de inhibición. Una posibilidad es que los rotavirus induzcan la expresión de RLI una proteína celular inhibidora de la RNasa L, y que es un mecanismo explotado por otros virus.



## Referencias

- Aguilar, P. V., Weaver, S. C. & Basler, C. F. (2007).** Capsid protein of eastern equine encephalitis virus inhibits host cell gene expression. *J Virol* **81**, 3866-3876.
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C. F. & Lopez, S. (2009).** Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol* **83**, 8819-8831.
- Balachandran, S. & Barber, G. N. (2004).** Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* **5**, 51-65.
- Beattie, E., Denzler, K. L., Tartaglia, J., Perkus, M. E., Paoletti, E. & Jacobs, B. L. (1995).** Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol* **69**, 499-505.
- Bergmann, M., Garcia-Sastre, A., Carnero, E., Pehamberger, H., Wolff, K., Palese, P. & Muster, T. (2000).** Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol* **74**, 6203-6206.
- Berlanga, J. J., Ventoso, I., Harding, H. P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L. & de Haro, C. (2006).** Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J* **25**, 1730-1740.
- Bernales, S., Papa, F. R. & Walter, P. (2006).** Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 487-508.
- Black, T. L., Safer, B., Hovanessian, A. & Katze, M. G. (1989).** The cellular 68,000-Mr protein kinase is highly autophosphorylated and activated yet significantly degraded during poliovirus infection: implications for translational regulation. *J Virol* **63**, 2244-2251.
- Brush, M. H., Weiser, D. C. & Shenolikar, S. (2003).** Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *MolCell Biol* **23**, 1292-1303.
- Burysek, L. & Pitha, P. M. (2001).** Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Virol* **75**, 2345-2352.
- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F. & Burrone, O. R. (2005).** RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *JGenVirol* **86**, 1481-1487.
- Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B. & Jagus, R. (1993).** Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *JBiolChem* **268**, 12837-12842.
- Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Flamez, D., Boyce, M., Yuan, J. & Eizirik, D. L. (2007).** Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *JBiolChem* **282**, 3989-3997.
- Connor, J. H. & Lyles, D. S. (2005).** Inhibition of host and viral translation during vesicular stomatitis virus infection. eIF2 is responsible for the inhibition of viral but not host translation. *JBiolChem* **280**, 13512-13519.

- Cheng, G., Feng, Z. & He, B. (2005).** Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. *J Virol* **79**, 1379-1388.
- Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. (2005).** GCN2 whets the appetite for amino acids. *MolCell* **18**, 141-142.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A. C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F. & Dever, T. E. (2005).** Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* **122**, 901-913.
- Estes, M. K. & Cohen, J. (1989).** Rotavirus gene structure and function. *MicrobiolRev* **53**, 410-449.
- Estes, M. K. & Graham, D. Y. (1985).** Rotavirus antigens. *Adv Exp Med Biol* **185**, 201-214.
- Estes, M. K. & Kapikian, A. Z. (2006).** Rotaviruses. In *Fields Virology*, Fifth edn, pp. 1917-1974. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia.
- Fabian, J. R., Kimball, S. R., Heinzinger, N. K. & Jefferson, L. S. (1997).** Subunit assembly and guanine nucleotide exchange activity of eukaryotic initiation factor-2B expressed in Sf9 cells. *JBiolChem* **272**, 12359-12365.
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R. & Katze, M. G. (1998).** Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *MolCell Biol* **18**, 5208-5218.
- Gilber, J. M., Feng, N., Patton, J. T. & Greenberg, H. B. (2001).** Rotavirus assembly - interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *ArchVirol* **146**, 1155-1171.
- Gonzalez, R. A., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. (2000).** Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol* **145**, 1963-1973.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. & Sonenberg, N. (1998).** A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *MolCell Biol* **18**, 334-342.
- Groppo, R. & Richter, J. D. (2009).** Translational control from head to tail. *CurrOpinCell Biol* **21**, 444-451.
- Gunnery, S., Rice, A. P., Robertson, H. D. & Mathews, M. B. (1990).** Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus 1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase. *ProcNatlAcadSciUSA* **87**, 8687-8691.
- Hakki, M., Marshall, E. E., De Niro, K. L. & Geballe, A. P. (2006).** Binding and nuclear relocalization of protein kinase R by human cytomegalovirus TRS1. *JVirol* **80**, 11817-11826.
- He, B., Gross, M. & Roizman, B. (1997).** The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *ProcNatlAcadSciUSA* **94**, 843-848.
- Herring, A. J., Inglis, N. F., Ojeh, C. K., Snodgrass, D. R. & Menzies, J. D. (1982).** Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* **16**, 473-477.

- Holcik, M. & Sonenberg, N. (2005).** Translational control in stress and apoptosis. *NatRevMolCell Biol* **6**, 318-327.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H. P. & Ron, D. (2003).** Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *JCell Biol* **163**, 767-775.
- Kaufman, R. J. (1999).** Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *ProcNatlAcadSciUSA* **96**, 11693-11695.
- Kawagishi-Kobayashi, M., Cao, C., Lu, J., Ozato, K. & Dever, T. E. (2000).** Pseudosubstrate inhibition of protein kinase PKR by swine pox virus C8L gene product. *Virology* **276**, 424-434.
- Krahling, V., Stein, D. A., Spiegel, M., Weber, F. & Muhlberger, E. (2009).** Severe acute respiratory syndrome coronavirus triggers apoptosis via protein kinase R but is resistant to its antiviral activity. *JVirol* **83**, 2298-2309.
- Krishnamoorthy, J., Mounir, Z., Raven, J. F. & Koromilas, A. E. (2008).** The eIF2alpha kinases inhibit vesicular stomatitis virus replication independently of eIF2alpha phosphorylation. *Cell Cycle* **7**, 2346-2351.
- Li, S., Peters, G. A., Ding, K., Zhang, X., Qin, J. & Sen, G. C. (2006).** Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *ProcNatlAcadSciUSA* **103**, 10005-10010.
- Lobo, M. V., Martin, M. E., Perez, M. I., Alonso, F. J., Redondo, C., Alvarez, M. I. & Salinas, M. (2000).** Levels, phosphorylation status and cellular localization of translational factor eIF2 in gastrointestinal carcinomas. *HistochemJ* **32**, 139-150.
- Lopez, S. & Arias, C. F. (2004).** Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* **12**, 271-278.
- Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S. & Arias, C. F. (2005).** Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *JGenVirol* **86**, 1609-1617.
- Lu, L., Han, A. P. & Chen, J. J. (2001).** Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *MolCell Biol* **21**, 7971-7980.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1995).** Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**, 222-228.
- Lloyd, R. M. & Shatkin, A. J. (1992).** Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *JVirol* **66**, 6878-6884.
- Melville, M. W., Tan, S. L., Wambach, M., Song, J., Morimoto, R. I. & Katze, M. G. (1999).** The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *JBiolChem* **274**, 3797-3803.
- Merrick, W. C. & Anderson, W. F. (1975).** Purification and characterization of homogeneous protein synthesis initiation factor M1 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **250**, 1197-1206.
- Mohr, I. (2006).** Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res* **119**, 89-99.

- Montero, H., Arias, C. F. & Lopez, S. (2006).** Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* **80**, 9031-9038.
- Montero, H., Rojas, M., Arias, C. F. & Lopez, S. (2008).** Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J Virol* **82**, 1496-1504.
- Mulvey, M., Arias, C. & Mohr, I. (2006).** Resistance of mRNA translation to acute endoplasmic reticulum stress-inducing agents in herpes simplex virus type 1-infected cells requires multiple virus-encoded functions. *J Virol* **80**, 7354-7363.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. (2001).** Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**, 1011-1022.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P. & Ron, D. (2003).** Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* **22**, 1180-1187.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C. F. & Lopez, S. (2002).** Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**, 190-200.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. & Glass, R. I. (2003).** Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* **9**, 565-572.
- Patton, J. T. (2001).** Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found Symp* **238**, 64-77; discussion 77-81.
- Patton, J. T. & Gallegos, C. O. (1990).** Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol* **71** ( Pt 5), 1087-1094.
- Patton, J. T., Kearny, K. & Taraporewala, Z. F. (2003).** Rotavirus genome replication: role of the RNA-binding proteins. *In Viral Gastroenteritis*, 165-184.
- Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J. & Ramig, R. F. (1996).** cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol* **70**, 3961-3971.
- Pavitt, G. D., Ramaiah, K. V., Kimball, S. R. & Hinnebusch, A. G. (1998).** eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev* **12**, 514-526.
- Pedley, S., Bridger, J. C., Brown, J. F. & McCrae, M. A. (1983).** Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J Gen Virol* **64** (Pt 10), 2093-2101.
- Pestova, T. V., Lorsch, J. R. & Hellen, C. U. T. (2007).** The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. In *Translational Control in Biology and Medicine*, pp. 87-128. Edited by M. B. Mathews, N. Sonenberg & J. W. B. Hershey. Cold Spring Harbor, Press: Cold Spring Harbor NY.
- Poncet, D. (2003).** Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell, p. 185-205. In U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral Gastroenteritis*, Amsterdam.
- Poppers, J., Mulvey, M., Khoo, D. & Mohr, I. (2000).** Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* **74**, 11215-11221.
- Prevot, D., Darlix, J. L. & Ohlmann, T. (2003).** Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* **95**, 141-156.
- Proud, C. G. (2005).** eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 3-12.
- Raaben, M., Groot Koerkamp, M. J., Rottier, P. J. & de Haan, C. A. (2007).** Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA

- decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell Microbiol* **9**, 2218-2229.
- Ramelot, T. A., Cort, J. R., Yee, A. A., Liu, F., Goshe, M. B., Edwards, A. M., Smith, R. D., Arrowsmith, C. H., Dever, T. E. & Kennedy, M. A. (2002).** Myxoma virus immunomodulatory protein M156R is a structural mimic of eukaryotic translation initiation factor eIF2alpha. *JMolBiol* **322**, 943-954.
- Ramig, R. F. (2004).** Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* **78**, 10213-10220.
- Robert, F., Kapp, L. D., Khan, S. N., Acker, M. G., Kolitz, S., Kazemi, S., Kaufman, R. J., Merrick, W. C., Koromilas, A. E., Lorsch, J. R. & Pelletier, J. (2006).** Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *MolBiolCell* **17**, 4632-4644.
- Romano, P. R., Zhang, F., Tan, S. L., Garcia-Barrio, M. T., Katze, M. G., Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. (1998).** Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *MolCell Biol* **18**, 7304-7316.
- Ron, D. (2002).** Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *JClinInvest* **110**, 1383-1388.
- Sanchez-San Martin, C., Lopez, T., Arias, C. F. & Lopez, S. (2004).** Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**, 2310-2318.
- Sasaki, J. & Nakashima, N. (1999).** Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro. *JVirol* **73**, 1219-1226.
- Schneider, R. J., Safer, B., Munemitsu, S. M., Samuel, C. E. & Shenk, T. (1985).** Adenovirus VAI RNA prevents phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit subsequent to infection. *ProcNatlAcadSciUSA* **82**, 4321-4325.
- Schuck, P., Taraporewala, Z., McPhie, P. & Patton, J. T. (2001).** Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J Biol Chem* **276**, 9679-9687.
- Sharp, T. V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C. G., Hilse, K. & Clemens, M. J. (1993).** Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res* **21**, 4483-4490.
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2004).** Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *JVirol* **78**, 7763-7774.
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. (2009).** Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745.
- Swaminathan, S., Rajan, P., Savinova, O., Jagus, R. & Thimmapaya, B. (1996).** Simian virus 40 large-T bypasses the translational block imposed by the phosphorylation of eIF-2 alpha. *Virology* **219**, 321-323.
- Tan, S. L. & Katze, M. G. (1998).** Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 757-766.

- Vattem, K. M. & Wek, R. C. (2004).** Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11269-11274.
- Vazquez de Aldana, C. R. & Hinnebusch, A. G. (1994).** Mutations in the GCD7 subunit of yeast guanine nucleotide exchange factor eIF-2B overcome the inhibitory effects of phosphorylated eIF-2 on translation initiation. *MolCell Biol* **14**, 3208-3222.
- Ventoso, I., Sanz, M. A., Molina, S., Berlanga, J. J., Carrasco, L. & Esteban, M. (2006).** Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* **20**, 87-100.
- Wang, X., Liao, Y., Yap, P. L., Png, K. J., Tam, J. P. & Liu, D. X. (2009).** Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining de novo protein synthesis in virus-infected cells. *J Virol* **83**, 12462-12472.
- Wek, S. A., Zhu, S. & Wek, R. C. (1995).** The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *MolCell Biol* **15**, 4497-4506.
- WHO (2009).** <http://www.who.int/nuvi/rotavirus/en/>.
- Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U. & Sarnow, P. (2000).** Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **102**, 511-520.
- Williams, B. R. (1999).** PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**, 6112-6120.

## Rotavirus Infection Induces the Phosphorylation of eIF2 $\alpha$ but Prevents the Formation of Stress Granules<sup>∇</sup>

Hilda Montero, Margarito Rojas, Carlos F. Arias, and Susana López\*

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

Received 13 August 2007/Accepted 12 November 2007

**Early during the infection process, rotavirus causes the shutoff of cell protein synthesis, with the nonstructural viral protein NSP3 playing a vital role in the phenomenon. In this work, we have found that the translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) in infected cells becomes phosphorylated early after virus infection and remains in this state throughout the virus replication cycle, leading to a further inhibition of cell protein synthesis. Under these restrictive conditions, however, the viral proteins and some cellular proteins are efficiently translated. The phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was shown to depend on the synthesis of three viral proteins, VP2, NSP2, and NSP5, since in cells in which the expression of any of these three proteins was knocked down by RNA interference, the translation factor was not phosphorylated. The modification of this factor is, however, not needed for the replication of the virus, since mutant cells that produce a nonphosphorylatable eIF2 $\alpha$  sustained virus replication as efficiently as wild-type cells. In uninfected cells, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  induces the formation of stress granules, aggregates of stalled translation complexes that prevent the translation of mRNAs. In rotavirus-infected cells, even though eIF2 $\alpha$  is phosphorylated these granules are not formed, suggesting that the virus prevents the assembly of these structures to allow the translation of its mRNAs. Under these conditions, some of the cellular proteins that form part of these structures were found to change their intracellular localization, with some of them having dramatic changes, like the poly(A) binding protein, which relocates from the cytoplasm to the nucleus in infected cells, a relocation that depends on the viral protein NSP3.**

While every step of the translation process is amenable to regulation, under most circumstances mRNA translation primarily is regulated at the level of initiation (8). The translation of eukaryotic mRNAs involves the recognition and recruitment of mRNAs by the translation initiation machinery and the assembly of the 80S ribosome on the mRNA; this process is mediated by the eukaryotic initiation factors (eIFs). Translation initiation is a complex process that begins with the recognition of the cap nucleotide structure (m7GpppN) at the 5' end of mRNAs by the cap binding protein eIF4E, which is part of the cap binding complex eIF4F. This complex is composed of eIF4E, eIF4A (which is an ATP-dependent RNA helicase), and the scaffolding protein eIF4G. eIF4F functions as a cap-dependent RNA helicase that promotes the association of the mRNA with the 40S ribosomal subunit. The binding of Met-tRNA to the 40S ribosomal subunit is mediated by a ternary complex composed of eIF2-GTP-Met-tRNA (15). The release of eIFs is assisted by eIF5, which facilitates the hydrolysis of GTP carried out by eIF2. The GDP on eIF2 is exchanged for GTP by eIF2B in a regulated manner that is essential for ensuing rounds of initiation (29).

Many types of stresses reduce global translation by triggering the phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) at residue Ser51. This phosphorylation inhibits the exchange of GDP for GTP catalyzed by eIF2B, which then is sequestered in

a complex with eIF2. Since the cellular level of eIF2B is 10 to 20 times lower than the level of eIF2, even small changes in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  have a drastic effect on protein translation. Four protein kinases are known to phosphorylate Ser51 in eIF2 $\alpha$ : the heme-regulated inhibitor kinase; the protein kinase RNA (PKR), activated by double-stranded RNA (dsRNA); PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK), which is activated in response to ER stress; and the general control nonderepressible-2 kinase (reviewed in reference 33). These kinases serve to arrest translation in various conditions that threaten cell survival, such as viral infection, nutrient deprivation, and misfolded proteins.

A recently characterized phenomenon associated with the arrest in protein synthesis is the formation of stress granules (SGs), which are cytoplasmic aggregates of stalled translational preinitiation complexes that accumulate during stress. It has been proposed that SGs are sites of mRNA triage at which mRNAs are monitored for integrity and composition and then are routed to sites of reinitiation, degradation, or storage (2, 3, 6, 18, 23). Messenger RNAs within SGs are not degraded, making them available for rapid reinitiation in cells that recover from stress. The related RNA binding proteins TIA-1 and TIAR are robust markers of these cytoplasmic foci (19); these proteins are present in the nucleus of most cells, and in response to a given stress they move to the cytoplasm, where they rapidly aggregate to form the SGs (reviewed in references 2 and 3). The SGs are formed by small, but not large, ribosomal subunits (18, 20), translation factors like eIF3, eIF4G, and eIF4E, the poly(A) binding protein (PABP), and proteins that regulate mRNA function, such as HuR, G3BP, and SMN, among others (13, 16, 18, 19, 39).

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

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 21 November 2007.

Rotaviruses are the leading etiologic agents of severe diarrheal disease in infants and young children, being responsible for an estimated 600,000 annual deaths globally, which places a significant economic burden on the global health care system (28). These viruses have a genome composed of 11 segments of dsRNA enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. During or shortly after cell entry, the infecting virus uncoats, losing the two surface proteins and yielding a double-layered particle that is transcriptionally active. The viral mRNAs contain 5'-methylated cap structures but lack the poly(A) tail characteristic of most cellular mRNAs. Instead, rotavirus mRNAs have at their 3' end a consensus sequence (UGACC) that is conserved in all 11 viral genes (31). The viral transcripts direct the synthesis of six structural (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural (NSP1 to NSP6) proteins (10). Once a critical mass of viral proteins are synthesized, they accumulate into discrete, large cytoplasmic inclusions, termed viroplasm, in which the replication of the virus genome and the assembly of transcriptionally active progeny double-layered particles are believed to take place (11, 37). The nonstructural proteins NSP2 and NSP5 have been shown to be essential for viroplasm formation, such that in the absence of either one of them no viroplasm are formed and the viral replication cycle is blocked (22, 37).

Early in the infection process rotavirus takes over the host translation machinery, causing a shutoff of cell protein synthesis. In this work, we report that the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated early after virus infection and stays phosphorylated throughout the replicative cycle of the virus. Under these conditions the viral proteins are efficiently translated, while most of the cell protein synthesis is arrested. We also found that in infected cells, SGs are not formed, although some of the proteins known to form part of these structures change their intracellular localizations.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells, viruses, and antibodies.** The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS). Wild-type (wt) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and MEFs expressing S51A mutant eIF2 $\alpha$  (S51A) were obtained from N. Sonenberg, McGill University, Montreal, Canada. These cells were grown in high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1 $\times$  nonessential amino acids. Rhesus rotavirus strain RRV was obtained from H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA, and was propagated in MA104 cells as described previously (27). Rotavirus lysates were activated with trypsin (10  $\mu$ g/ml; Gibco-BRL) for 30 min at 37°C. Antibodies used include mouse monoclonal antibodies against TIA-1 (generously provided by Paul Anderson, Boston, MA); VP2 (MAb 3A8), provided by H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA; PABP and eIF4E (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); and ribosomal protein S6 (Cell Signaling). Rabbit polyclonal sera to NSP2, NSP3, and NSP5 have been described previously (14); polyclonal antibodies to purified RRV triple-layered particles were produced in rabbits as described previously (21), and rabbit anti-phosphorylated-eIF2 $\alpha$  (anti-phospho-eIF2 $\alpha$ ) was purchased from Cell Signaling. The secondary antibodies used were goat anti-mouse coupled to Alexa 568 or 488 and goat anti-rabbit coupled to Alexa 488 or 568 (Molecular Probes, Eugene, OR).

**siRNA transfection.** Duplex short interfering RNAs (siRNAs) were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO), and the target sequences used for each gene are shown in Table 1. The transfection of siRNAs into MA104 cells was performed as previously described (21). Briefly, the siRNAs were transfected using Lipofectamine (Invitrogen). The transfection mixture was added to confluent cell monolayers and incubated for 8 h at 37°C. After this incubation, the

TABLE 1. Sequence of the siRNAs derived from the RRV genome used in this work

Gene product	siRNA sequence	Reference or source
Luciferase	AAG UCG GUU GCU AGU ACC AAC	This work
VP1	ACC AGU GAA UGU CGA UAA AGG	This work
VP2	CUA GGC AAC UAC CAG UAU AGU	This work
VP3	GAA GGU AUG UUG UGU UAA AGA	This work
VP4	UCU AGG UCC UUU UGC UCA AUU	7
VP6	TGG AAC GAU AAU AGC CAG AAA	This work
VP7	AAG UCG CUA CAG CUG AAA AAC	21
NSP1	AAU UGG AGC AAA UUC AGU AUG	This work
NSP2	GCG UUG AAU UCA AUU AAA GUU	This work
NSP3	AAU UGG AUG ACU GAC UCU CGA	26
NSP4	AAG GCC UCG GUU CCA ACC AUG	21
NSP5	AAU CAU CUU CAA CGA CGU CAA	5

mixture was removed and the cells were kept in MEM with 0.7% FBS for 48 h at 37°C prior to virus infection.

**Radiolabeling of proteins.** For protein labeling, cells grown in 48-well plates were transfected with the indicated siRNAs and infected with rotavirus strain RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 3. At the indicated times, the medium was replaced by MEM without methionine, supplemented with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy Tag Express-<sup>35</sup>S labeling mix (Dupont NEN), and incubated for different periods of time at 37°C, as indicated. The samples were resolved by sodium dodecyl sulfate–10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–10% PAGE), adjusting the amount of protein loaded in each lane by Coomassie blue staining, and then examined by autoradiography.

**Immunoblot analysis.** Cells were lysed for 15 min at 4°C in lysis buffer containing 25 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM Tris (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, and 1% Triton X-100, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete, EDTA-free; Roche). The lysates were centrifuged for 5 min at 10,000  $\times$  g, and the supernatants were collected. Samples were diluted in Laemmli sample buffer, denatured by boiling for 5 min, subjected to SDS–10% PAGE, and transferred to Immobilon NC (Millipore) membranes. The membranes were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% nonfat dry milk and incubated with the indicated antibodies. Polyclonal antibodies to eIF2 $\alpha$  and phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser51) were used as recommended by the manufacturer (Cell Signaling), and viral structural proteins were detected using antibodies against triple-layered particles or using monospecific antibodies against the nonstructural proteins. The bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody and the Western Lightning system (Perkin Elmer).

**Immunofluorescence.** Cells on coverslips were fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, and the coverslips were washed four times with PBS with 50 mM ammonium chloride. The fixed cells were permeabilized by incubation in 0.5% Triton X-100 in PBS with 50 mM ammonium chloride and 1% bovine serum albumin (BSA) and then were blocked by incubation with 1% BSA, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS at 4°C overnight. The coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature, followed by an incubation with the corresponding secondary antibody for 1 h at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Fluoprep (BioMérieux). The slides were analyzed with an E600 epifluorescence microscope coupled to a DXM1200 digital still camera (Nikon).

#### RESULTS

##### Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .

To establish whether rotavirus infection triggers the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , we determined the phosphorylation state of this translation factor in infected cells by immunoblot analysis using antibodies specific for either total eIF2 $\alpha$  or the phosphorylated form of this protein. As a positive control, we used drug treatments known to induce cellular stress, like thapsigargin, which induces ER stress by depleting ER Ca<sup>2+</sup> stores and activates PERK, and sodium arsenite, which induces oxidative stress and promotes the activation of heme-regulated inhibitor



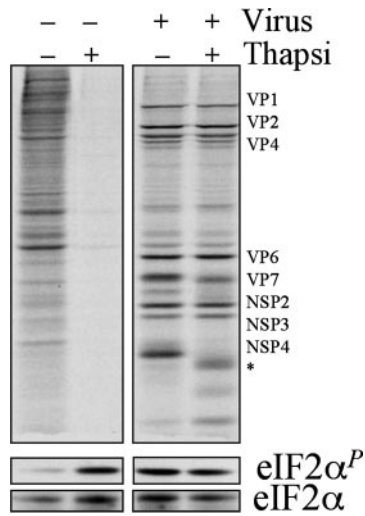


FIG. 1. eIF2 $\alpha$  is phosphorylated in rotavirus-infected cells. MA104 cells were mock infected or infected with rotavirus strain RRV at an MOI of 3. Five hours postinfection, the cells were left unstressed or were stressed with 400 nM of thapsigargin (Thapsi) for 30 min, and the cells then were metabolically labeled with 25  $\mu$ Ci/ml Easy Tag Express- $^{35}$ S for 30 min (maintaining the drug during the labeling period). The cells were lysed, and equivalent amounts of total protein were subjected to SDS-10% PAGE and detected by autoradiography (top panels) or transferred to nitrocellulose and probed with the indicated specific antisera (eIF2 $\alpha$ , total eIF2 $\alpha$  sera; eIF2 $\alpha^P$ , phosphorylation-specific eIF2 $\alpha$  sera) (bottom panels). The asterisk indicates the migration of the unglycosylated form of NSP4 that appeared when the cells were treated with thapsigargin.

kinase (not shown) (17, 24, 32). Cells either were left uninfected or infected with rotavirus strain RRV, and 5 h postinfection (hpi) the cells were treated with thapsigargin for 30 min and then metabolically labeled for 30 min (maintaining the drug during the labeling period). The pattern of viral proteins was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography, and the total and phosphorylated forms of eIF2 $\alpha$  were detected by Western blotting (Fig. 1). In mock-infected cells, thapsigargin caused a severe shutoff of cellular protein synthesis that correlated with the highly phosphorylated state of eIF2 $\alpha$  in these cells (Fig. 1). In cells infected with rotavirus either in the presence or absence of the drug, eIF2 $\alpha$  became phosphorylated as much as it did in uninfected thapsigargin-treated cells. Under these conditions, the synthesis of viral proteins was very efficient (Fig. 1). Interestingly, in infected cells the inhibition of the cell protein synthesis was somewhat lessened (Fig. 1).

**eIF2 $\alpha$  remains phosphorylated throughout the rotavirus replication cycle.** In general, cellular stress causes transient changes in the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$ . Amino acid starvation and ER stress cause a transient phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during the first hour of treatment, whereas dsRNA causes a sustained phosphorylation of this initiator factor (12). To determine if this was the case for rotavirus infection, we analyzed by Western blotting the protein synthesis pattern and the phosphorylation state of eIF2 $\alpha$  at different times postinfection; as a control, cells were treated with thapsigargin for different times. Using the phosphospecific antibody, we found that when the cells were stressed with thapsigargin, there was a rapid transient increase in phospho-eIF2 $\alpha$  that was maximal at 1 h posttreatment (hpt) and returned to basal levels 2 h later (3 hpt); the synthesis of cellular proteins was severely inhibited while the translation factor was phosphorylated, and it was

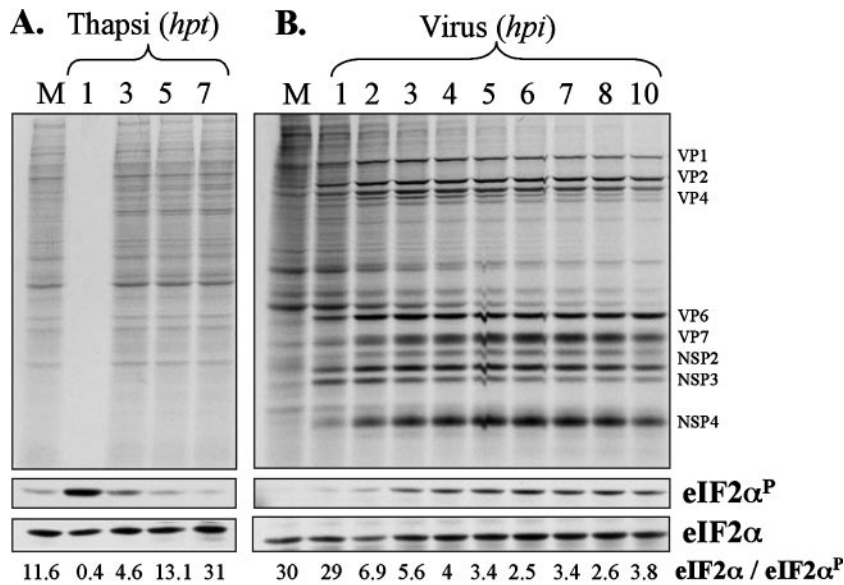


FIG. 2. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is maintained during the replicative cycle of rotavirus. (A) MA104 cells were treated with 400 nM of thapsigargin (Thapsi) for 1 h and then were harvested at the indicated times posttreatment (hpt); 30 min before being harvested, the cells were metabolically labeled with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy Tag Express- $^{35}$ S (maintaining the drug during the labeling period). (B) Cells were infected (virus) or mock infected (M), and 30 min before the indicated times postinfection (hpi) the cells were metabolically labeled with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy Tag Express- $^{35}$ S. The labeled proteins were resolved by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography. The same samples were analyzed by Western blotting using antibodies against phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha^P$ ) or total eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). The ratio of total eIF2 $\alpha$  to phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha^P$ ) is shown at the bottom of the Western blots.

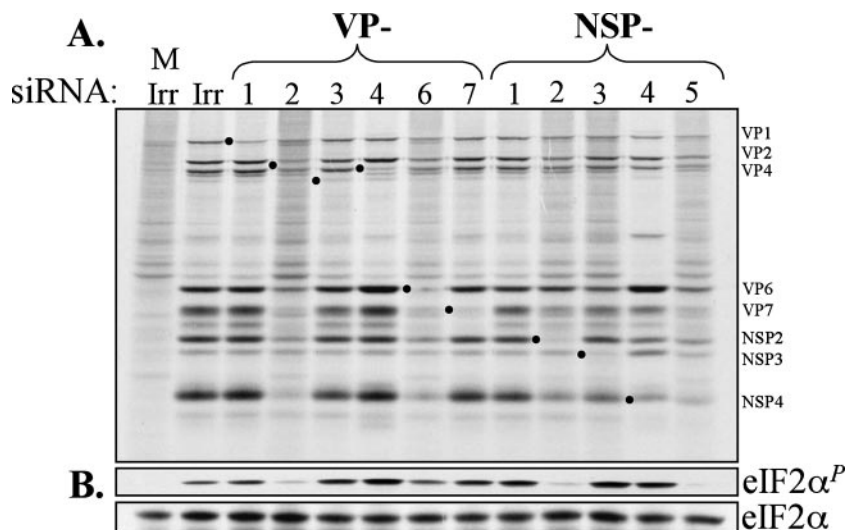


FIG. 3. VP2, NSP2, and NSP5 are involved in eIF2 $\alpha$  phosphorylation. Cells were transfected with the indicated siRNA as described in Materials and Methods. (A) Forty-eight hours posttransfection, the cells were mock infected (M) or infected with RRV at an MOI of 3, and 5.5 hpi they were radiolabeled for 30 min with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy Tag Express-[<sup>35</sup>S] and then lysed. Mock-infected cells were not transfected. The labeled proteins were resolved by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography (A) or by immunoblot analysis of phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha^P$ ) or total eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) (B). Dots at the left of each lane indicate the knocked-down protein. Irr, irrelevant (control) siRNA.

restored when the factor was no longer phosphorylated (Fig. 2A). In contrast, in cells infected with rotavirus, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was apparent by 2 hpi, and it was sustained up to 10 hpi (Fig. 2B). Nevertheless, the synthesis of viral proteins was very efficient under these conditions, indicating that the viral mRNAs, as well as some selected cellular mRNAs, can be translated even though eIF2 $\alpha$  is phosphorylated.

**eIF2 $\alpha$  is not phosphorylated when VP2, NSP2, and NSP5 are knocked down.** To determine if individual rotaviral proteins were involved in inducing/maintaining the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$ , we silenced the expression of each rotavirus gene by RNA interference (RNAi). In addition to the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , we also evaluated the effect of knocking down each protein on the synthesis of viral and cellular proteins. The cells were transfected with chemically synthesized siRNAs that target each one of the 11 RRV genes or with an siRNA complementary to the firefly luciferase gene as an irrelevant control. The effectiveness of each siRNA initially was confirmed by Western blotting or semiquantitative reverse transcription-PCR (7, 21, 22 and data not shown). In these assays, MA104 cells were transfected with each siRNA, infected with RRV 48 h posttransfection, and metabolically labeled for 30 min at 5.5 hpi. The synthesis of viral and cellular proteins was assessed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 3). In the gel shown in Fig. 3, with the exception of NSP1 and NSP5, which are not detectable under the PAGE conditions used, the knockdown of every viral protein was apparent when the corresponding siRNA was used. In general, silencing the expression of the VP1, VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP3, and NSP4 genes did not significantly affect the amount of total viral protein synthesized, whereas the synthesis of cellular proteins was shut off, except when NSP3 was silenced, since this protein is involved in the inhibition of the cellular protein synthesis (26, 30). In contrast, silencing the expression of the VP2, VP6, NSP2, and NSP5 genes caused a general reduction in the

synthesis of the viral proteins, which correlated in all cases with an increased synthesis of cellular proteins.

By Western blot analysis we found that eIF2 $\alpha$  was phosphorylated in RRV-infected cells transfected with all siRNAs, with the exception of those cells that received the siRNAs targeting the synthesis of VP2, NSP2, and NSP5, in which the phosphorylation of the translation factor was abolished (Fig. 3B). In the absence of VP6, eIF2 $\alpha$  was phosphorylated, although to a lower level than that found in control cells transfected with the irrelevant siRNA. These results suggest that these proteins are directly or indirectly involved in inducing or maintaining the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . Since the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  at a given time is the result of the equilibrium between the activities of the kinase(s)/phosphatase(s) involved, the phosphorylation state of eIF2 $\alpha$  was determined at different times postinfection in cells in which either VP2, NSP2, or NSP5 was silenced. By Western blotting we found that this factor was not phosphorylated between 2 and 7 hpi in cells transfected with the siRNA to NSP2 or NSP5 (Fig. 4A). However, in cells in which VP2 was knocked down, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  followed the kinetics observed in control cells transfected with an irrelevant siRNA for up to 4 hpi, and after that time the equilibrium was clearly displaced in favor of the unphosphorylated state of the factor (Fig. 4A). These results indicate that the mechanism through which VP2 favors the phosphorylation state of eIF2 $\alpha$  is different from that employed by NSP2 and NSP5. Figure 4B shows the Western blot analysis of the presence of these viral proteins to corroborate the effectiveness of the siRNA-induced knockdowns.

**The number of viroplasm decreases throughout the infection process when VP2 is knocked down.** NSP2 and NSP5 are required and sufficient for the formation of viroplasm (11). Accordingly, silencing the expression of either of these two proteins prevented the formation of these viral structures (22, 37, and data not shown). On the other hand, silencing the

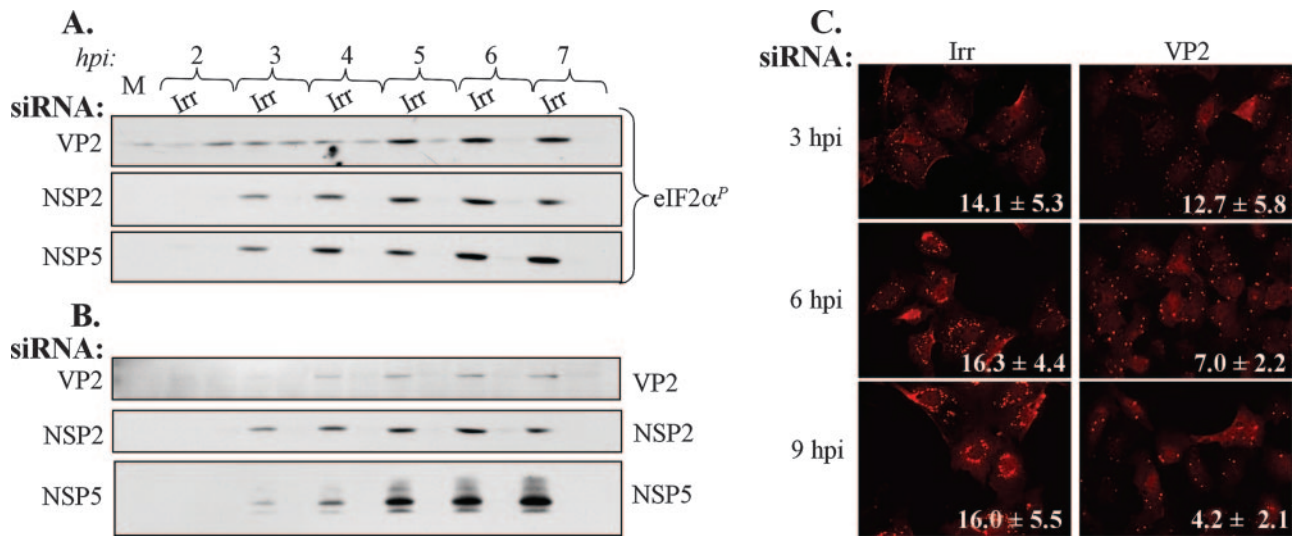


FIG. 4. Time course of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in VP2, NSP2, or NSP5 knockdown. Cells were transfected with the indicated siRNAs or with an siRNA control (Irr). (A) At 48 hpi, the cells were infected or left uninfected (M) and harvested at the indicated times postinfection (hpi). (B) Cell extracts were analyzed by Western blotting using antibodies against phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha^P$ ) or against VP2, NSP2, or NSP5. (C) The number of viroplasm decreases in VP2 knockdowns. Cells transfected with the siRNA to VP2 or with an irrelevant siRNA (Irr) were infected 48 hpi with RRV at an MOI of 3, and at the indicated times postinfection the cells were fixed and immunostained with a polyclonal rabbit antibody to NSP5 as the primary antibody, followed by incubation with goat anti-rabbit immunoglobulin G coupled to Alexa 568 as the secondary antibody. The average numbers of viroplasm per cell ( $\pm$  standard deviations) are shown; 100 cells per condition were counted.

expression of VP2 results in the formation of fewer viroplasm (see below). Based on this observation and on the fact that in the absence of VP2 the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is not blocked until 5 hpi, we determined if there was a correlation between the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  and the formation of viroplasm. For this, cells were transfected with the siRNA to VP2 or an irrelevant control; 48 h posttransfection the cells were infected with strain RRV, and at the indicated times postinfection the cells were fixed and immunostained with an anti-NSP5 antibody and the number of viroplasm per cell was counted (Fig. 4C). Interestingly, in cells transfected with the VP2 siRNA, the number of viroplasm decreased as the infection proceeded compared to that of cells transfected with irrelevant siRNA, and this decrement in the number of viroplasm correlated with the time at which eIF2 $\alpha$  appeared to be dephosphorylated (Fig. 4A), suggesting that the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was related to viroplasm formation.

**Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is required for neither viroplasm formation nor rotavirus replication.** To establish whether eIF2 $\alpha$  phosphorylation was required for the formation of viroplasm and ultimately for the replication of the virus, we took advantage of a well-characterized MEF cell line that produces a mutant form of eIF2 $\alpha$  in which serine 51 was changed to a nonphosphorylatable alanine (S51A) (35). Mutant or wt MEFs were infected with rotavirus, and at 5.5 hpi they were metabolically labeled with  $^{35}\text{S}$  for 30 min, the synthesis of cellular and viral proteins was analyzed by autoradiography, and the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was detected by Western blotting (Fig. 5A). As expected, upon rotavirus infection eIF2 $\alpha$  was phosphorylated in the wt-infected MEFs but not in the mutant S51A MEFs. The viral proteins, however, were efficiently synthesized in both wt and mutant cells, while the shutdown of cellular protein synthesis was somewhat less

pronounced in the mutant MEFs (Fig. 5A). Of interest, RRV replicated better in the mutant MEFs than in wt cells (the titer was  $1.8 \pm 0.2$  times higher for mutant MEFs), as judged from the viral progeny produced in these cells. Also, when the formation of viroplasm was characterized for both wt and mutant MEFs, we found that these viral structures formed in both cell lines, although in the mutant cells they appeared to be less abundant (Fig. 5C). Taken together, these results indicate that, at least in MEFs, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is required for neither the synthesis of rotavirus proteins nor the formation of viroplasm and production of infectious viral progeny. Our results also suggest that, in addition to the known role of rotavirus NSP3 (26, 30, 31), the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  also plays a role in the severe shutoff of cellular protein synthesis observed during rotavirus infection. To determine the relative contribution of these two factors to the inhibition of cellular mRNA translation, we silenced the expression of NSP3 in wt and S51A mutant MEFs and evaluated the synthesis of viral and cellular proteins by PAGE and autoradiography (Fig. 5A). When NSP3 was knocked down in wt MEFs, the synthesis of cellular proteins was partially recovered, while its restoration was complete in NSP3-silenced mutant MEFs. These results indicate that both NSP3 and the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  contribute to the severe shutoff of cell protein synthesis observed upon rotavirus infection. Interestingly, the synthesis of viral protein appeared not to be affected by the absence of NSP3 in MEFs, as we have already reported for MA104 cells (26).

**Rotavirus infection prevents the formation of SGs and causes the relocation of some cellular proteins.** It has been described that when eIF2 $\alpha$  is phosphorylated, stalled 48S preinitiation complexes are sequestered into punctate cytoplasmic aggregates known as SGs (2, 3, 19, 20). Since eIF2 $\alpha$

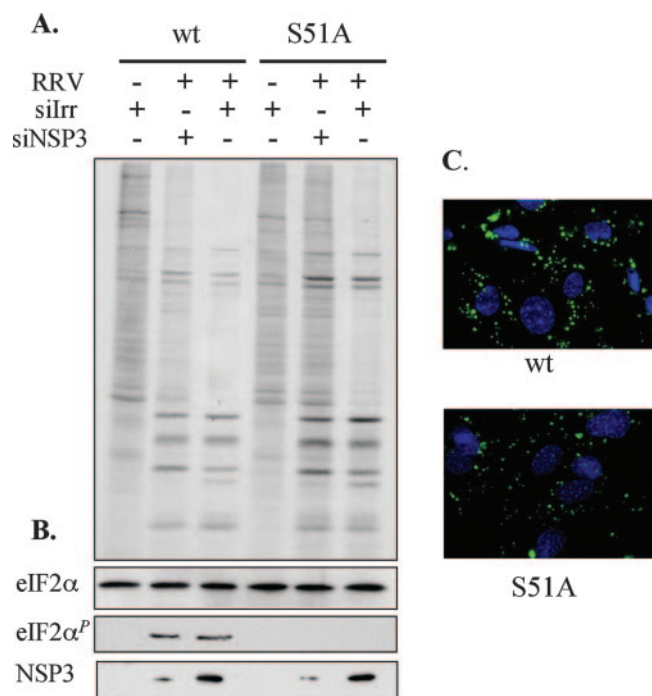


FIG. 5. Phosphorylation of eIF2α is not necessary for rotavirus replication. wt and mutant (S51A) MEFs were infected with rotavirus strain RRV at an MOI of 1 (+) or were mock infected (-), and 5.5 hpi the cells were metabolically labeled with 25 μCi/ml Easy Tag Express-<sup>[35S]</sup> for 30 min. Cells were lysed, and equivalent amounts of total protein were subjected to SDS-10% PAGE and autoradiography (top gel). siIrr, irrelevant (control) siRNA. siNSP3, siRNA directed to NSP3. (B) The same samples were transferred to nitrocellulose and analyzed by immunoblotting using antibodies against total eIF2α (eIF2α) or phospho-eIF2α (eIF2α<sup>P</sup>) or directed to NSP3 (NSP3). (C) wt and mutant (S51A) MEFs were infected with rotavirus strain RRV at an MOI of 3, and 8 hpi the cells were fixed and immunostained with a polyclonal rabbit antibody to NSP5 as the primary antibody, followed by incubation with goat-anti-rabbit immunoglobulin G coupled to Alexa 568 as the secondary antibody (in green). The cell nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (in blue).

becomes phosphorylated during rotavirus infection, we looked for SG formation in infected cells. Some of the cellular proteins that have been found to be present in SGs are TIA-1, eIF4E, PABP, and the ribosomal protein S6 (18-20); thus, we used antibodies to these proteins to immunostain MA104 cells infected with rotavirus or cells that had been subjected to stress by the addition of sodium arsenite to detect bona fide SGs (19). In uninfected, nontreated MA104 cells, PABP and the ribosomal protein S6 have a diffuse cytoplasmic distribution that slightly concentrates in the perinuclear region, while eIF4E has a cytoplasmic distribution that concentrates in punctate structures; the TIA-1 protein preferentially localized to the nuclei (Fig. 6A), as has been reported for other cell lines (19). When the cells were treated with sodium arsenite as a positive control, a fraction of PABP, S6, eIF4E, and TIA-1 appeared in SGs (Fig. 6A), indicating that these structures are indeed formed in MA104 cells; treatment of cells with thapsigargin or heat shock also resulted in the formation of these structures (not shown). To determine if, during rotavirus infection, SGs are formed, the cells were infected and analyzed by immuno-

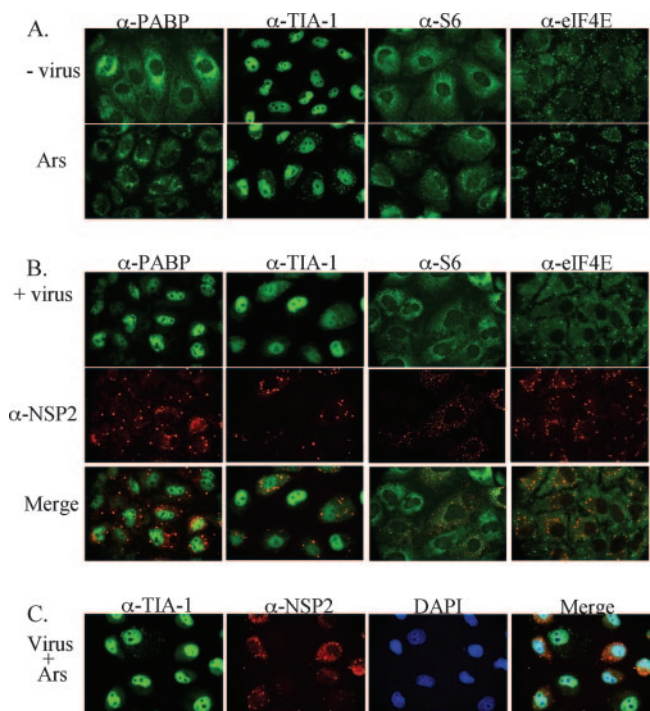


FIG. 6. SGs are not formed during rotavirus infection. MA104 cells were (A) untreated (- virus) or treated with 500 μM sodium arsenite for 1 h (Ars), (B) infected with rotavirus RRV at an MOI of 3 for 6 h (+ virus), or (C) infected at an MOI of 0.5 and treated with arsenite for 1 h at 5 hpi. Cells were fixed and processed for immunofluorescence using the indicated antibodies, as described in Materials and Methods. α-NSP2, antibody to NSP2; α-TIA-1, antibody to TIA-1; α-S6, antibody to S6; α-eIF4E, antibody to eIF4E; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

fluorescence 6 hpi; infected cells were detected with an antibody to NSP2, a nonstructural viral protein that stains viroplasm. We found that the TIA-1 protein exited the nucleus of rotavirus-infected cells, but it did not localize to coarse granular structures like those observed in arsenite-treated cells; rather, it localized as a fine punctate signal distributed homogeneously throughout the cytoplasm. In the case of eIF4E, its punctate cytoplasmic localization was still evident, although the number of spots was reduced compared to that of control noninfected cells, and most of the protein now was uniformly distributed in the cytoplasm. The distribution of ribosomal protein S6 became more uniform in infected cells, losing its apparent concentration around the nuclei, and surprisingly, the distribution of PABP changed dramatically, from the cytoplasm to the nuclei of the cells (Fig. 6). These results suggest that upon rotavirus infection, the formation of SGs is prevented and at least some of the proteins typical of SGs are redistributed in infected cells.

To determine if the infection of rotavirus indeed prevents the formation of SGs, a monolayer of MA104 cells was infected with rotavirus strain RRV at an MOI of 0.5, such that only a fraction of the cells in the monolayer were infected, and 6 hpi the cells were treated with sodium arsenite to induce the formation of SGs. By immunofluorescence we found that the cells that were infected, as evidenced by the presence of viroplasm, did not have SGs, and TIA-1 appeared diffuse in the

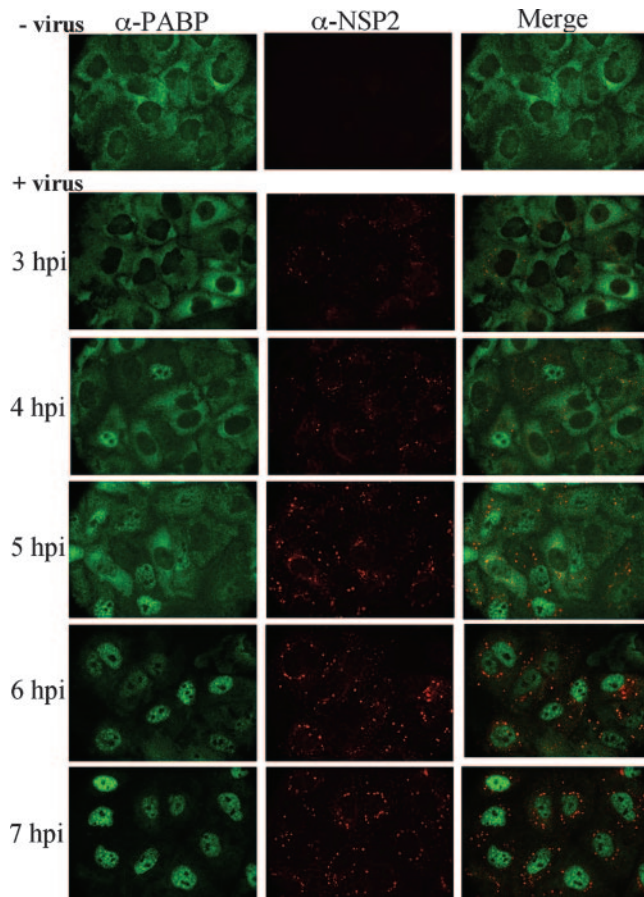


FIG. 7. PABP relocates to the nucleus of the cells infected with rotavirus. MA104 cells were infected at an MOI of 3, and at the indicated times postinfection the cells were fixed and processed for immunofluorescence using anti-PABP and anti-NSP2 antibodies ( $\alpha$ -PABP and  $\alpha$ -NSP2, respectively), as indicated.

cytoplasm, while SGs were present only in uninfected cells (not stained with the anti-NSP2 serum) (Fig. 6C). The same results were obtained when the cells were stained with antibodies directed to eIF4E and the ribosomal protein S6 (data not shown). These results confirm that the formation of SGs is prevented in rotavirus-infected cells, despite the fact that eIF2 $\alpha$  is mostly phosphorylated under these conditions.

**Relocalization of PABP to the nuclei in infected cells depends on the time course of infection and the presence of NSP3.** To determine which factors were involved in the translocation of PABP to the nucleus of the cell, we did a time course infection in which the cells were infected with RRV for different periods of time and then fixed and immunostained for PABP and NSP2. Figure 7 shows that PABP kept its cytoplasmic localization up to 3 hpi, and after that time it appeared to relocalize to the cell's nuclei, such that by 7 hpi most cells had a relocalized PABP. To determine the viral product(s) involved in the redistribution of PABP, we silenced the expression of each viral gene and analyzed the cells at 6 hpi with antibodies to PABP and to NSP2 (not shown). The relocalization of PABP was not prevented by silencing the expression of any rotavirus gene with the exception of the gene encoding NSP3, for which the translocation of PABP to the nucleus was

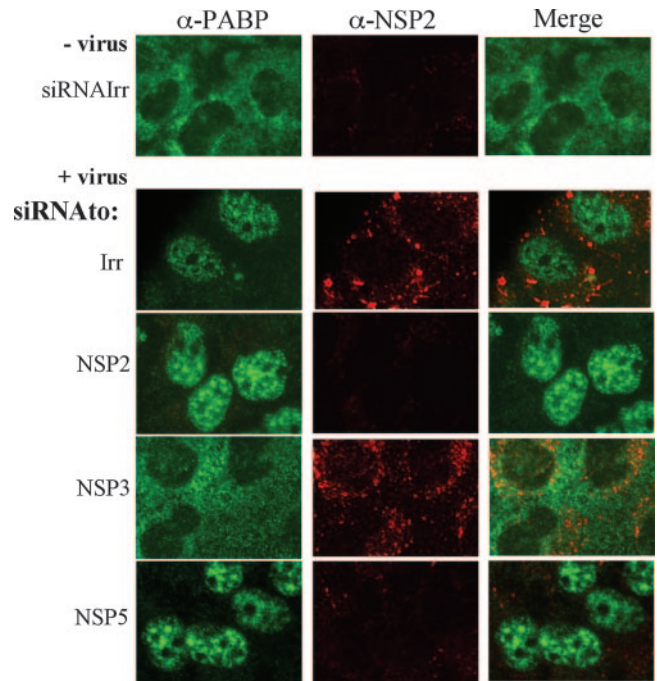


FIG. 8. Translocation of PABP to the nucleus depends on the presence of NSP3 and not on the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . Cells were transfected with the indicated siRNAs, and 48 hpt the cells were infected (+ virus) or mock infected (- virus) with RRV at an MOI of 3. Six hours postinfection the cells were fixed and processed for immunofluorescence, as described in Materials and Methods, using the indicated anti-PABP and anti-NSP2 antibodies ( $\alpha$ -PABP and  $\alpha$ -NSP2, respectively). Irr, irrelevant (control) siRNA.

completely abolished (Fig. 8). Interestingly, the relocalization of PABP seems to be independent of the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , since it localized in the nucleus of infected cells even when VP2 (not shown), NSP2, or NSP5 (Fig. 8) was silenced. These results also indicate that the relocalization of PABP to the nucleus requires only a limited amount of NSP3, since the amount of NSP3 and of the other viral proteins synthesized in the cells is very low when VP2, NSP2, and particularly NSP5 were silenced.

## DISCUSSION

As obligate intracellular parasites, viruses depend on the cell translation machinery for the production of their proteins. Thus, the replication of a virus requires that viral mRNAs compete successfully with cellular mRNAs for the host translation apparatus. Viruses have developed remarkable strategies to ensure the efficient translation of their mRNAs while simultaneously inhibiting cellular protein synthesis. The two main regulatory steps for the control of polypeptide chain initiation are the activity of eIF2 and the formation of the eIF4F complex, both of which have been shown to be targets of control by viruses (reviewed in references 4 and 36). In this work, we found that during rotavirus infection the initiation factor eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated and stays in this state throughout the replication cycle of the virus. However, under these conditions the synthesis of viral, and some cellular, proteins was not inhibited. Moreover, when rotavirus-infected

cells were treated with thapsigargin, which in uninfected cells induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and temporarily completely abolishes the synthesis of cellular proteins (Fig. 1), the synthesis of viral and cellular polypeptides was comparable to that observed in cells infected in the absence of the drug (Fig. 1). Thus, the activity of eIF2 that is lost upon phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of the factor is somehow compensated for or no longer required by infected cells. It also is clear that the mechanism that the virus uses to translate its mRNAs in the presence of phospho-eIF2 $\alpha$  also is used by some cellular mRNAs. The total cellular protein synthesis is nonetheless limited in infected cells, most probably due to the activity of the nonstructural virus protein NSP3, which is known to prevent the efficient translation of poly(A)-containing mRNAs (26, 30). Experiments are under way in our laboratory to characterize the cellular mRNAs that are translated under the restrictive conditions imposed by the virus infection.

It has been shown recently that the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , as well as the inhibition of translation factors that prevent the 40S subunit and its associated factors from forming a competent 80S particle, results in the formation of SGs (2, 3, 6, 18, 23). Of interest, we found that these structures did not form in rotavirus-infected cells, even though eIF2 $\alpha$  was phosphorylated. A likely scenario to explain these results is that upon rotavirus infection the host cell triggers the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  to arrest protein synthesis and prevent the translation of viral mRNAs, with the ensuing formation of SGs, aggregates of stalled translation complexes that prevent the translation of mRNAs; the formation of these structures during rotavirus infection would inhibit the translation of the viral mRNAs. We hypothesize that as a response to this host response, rotavirus has developed counterattack measures, one of which could be to prevent the formation of SGs to allow the efficient translation of the viral proteins. This possibility is supported by the observation that there is more cellular protein synthesis in cells infected with rotavirus, either treated with drugs known to cause cellular stress or left untreated, than when uninfected cells were treated with these drugs, suggesting that the window that the virus opens to translate its mRNAs also is useful for some cellular mRNAs. The mechanism by which the virus prevents the formation of SGs in the cells is not known, but its characterization would allow us to learn about the cellular signals that trigger the assembly and disassembly of these structures.

The kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in rotavirus-infected cells is not known, although two obvious candidates are PKR, induced by the presence of dsRNA, or PERK, which can be induced by the accumulation of viral proteins in the ER (41). When the expression of each viral gene was silenced through RNAi, we found that eIF2 $\alpha$  was not phosphorylated in the absence of VP2, NSP2, or NSP5, conditions under which there was little synthesis of viral proteins. It could be argued that the trigger that induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is the accumulation of viral protein; however, the fact that in VP2-silenced cells eIF2 $\alpha$  became phosphorylated during the first 4 hpi, when the synthesis of viral proteins is greatly inhibited, suggests that the mechanism of phosphorylation is not, or at least is not only, related to the accumulation of viral proteins. Although the input genomic dsRNA also could be a triggering factor, it was the same in all silencing

experiments and, thus, cannot explain the differences observed. Furthermore, the amount of viral RNA transcribed and replicated when each rotavirus gene was silenced does not correlate with the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  (C. Ayala-Breton, H. Arias, C. F. Arias, and S. Lopez, unpublished data). Thus, the explanation for the lack of phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in the absence of VP2, NSP2, or NSP5 is not simple, and it needs to be further investigated.

We also found in this work that, during rotavirus infection, several cellular proteins known to accumulate in SGs upon stress change their intracellular location even though they do not aggregate in these structures. The most drastic change observed was that of PABP, which usually is a cytoplasmic protein that, under stress conditions, accumulates in SGs, but in rotavirus-infected cells it relocates to the nucleus, which was found to be dependent on the presence of NSP3. It has been reported previously that PABP shuttles between the nucleus and the cytoplasm in cells in which either the transcription of cellular mRNAs was inhibited or the protein was overexpressed, and it was proposed that the export pathway of this protein is saturable (1). Based on our observations, an alternative explanation is that there is a pool of cytoplasmic PABP that is retained through its interaction with eIF4G; when this interaction does not occur, either because it is outcompeted by NSP3 or there is an excess of protein due to its overexpression (1), the unbound, excess cytoplasmic pool of PABP is shuttled back to the nucleus. Experiments are being carried out in our laboratory to test this hypothesis.

The observation that the synthesis of viral protein and the yield of viral progeny is not affected and might be even higher in MEFs that cannot phosphorylate eIF2 $\alpha$  compared to those of wt MEFs suggests that the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is not required for rotavirus replication, similar to what has been reported recently for the mouse hepatitis coronavirus (34) and in contrast to what has been observed for reovirus infection, which has been shown to induce a cellular stress response as well as the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , which favors the replication of these viruses (38). Other viruses known to induce the shutoff of cell protein synthesis and the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  are Semliki Forest virus (25), Sindbis virus (40), and herpes simplex virus type 1 (9), but in these cases, as well as in the case of murine hepatitis virus and reovirus but unlike the case of rotavirus, there is a robust formation of SGs in the infected cells. Thus, the mechanism by which different viruses deal with the host response to fight the virus invasion is diverse, and its characterization should allow us to learn about the signals that trigger the formation of SGs and the host stress response induced by a virus infection.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rafaela Espinosa for her technical assistance with cell culture, to Nahum Sonenberg and Mauro Costa-Mattioli for their help in acquiring the S57A MEFs, and to Paul Gaytan and Eugenio Lopez for their support with the synthesis of oligonucleotides.

This work was supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute. H.M. is a recipient of a scholarship from DGEP/UNAM and CONACYT.

#### REFERENCES

1. Afonina, E., R. Stauber, and G. N. Pavlakis. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 273:13015–13021.

2. Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**:803–808.
3. Anderson, P., and N. Kedersha. 2002. Stressful initiations. *J. Cell Sci.* **115**:3227–3234.
4. Bushell, M., and P. Sarnow. 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J. Cell Biol.* **158**:395–399.
5. Campagna, M., C. Eichwald, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 2005. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* **86**:1481–1487.
6. Dang, Y., N. Kedersha, W. K. Low, D. Romo, M. Gorospe, R. Kaufman, P. Anderson, and J. O. Liu. 2006. Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* **281**:32870–32878.
7. Déctor, M. A., P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **3**:1175–1180.
8. Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**:545–556.
9. Esclatine, A., B. Taddeo, and B. Roizman. 2004. Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. *J. Virol.* **78**:8582–8592.
10. Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication, p. 1747–1785. *In* B. N. Fields and D. N. Knipe (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
11. Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* **80**:333–339.
12. Fernandez, J., I. Yaman, P. Sarnow, M. D. Snider, and M. Hatzoglou. 2002. Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **277**:19198–19205.
13. Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, M. G. Stenberg, M. S. Swanson, A. Eversole, N. Maizels, and J. A. Steitz. 2000. HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:3073–3078.
14. González, R. A., R. Espinosa, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* **145**:1963–1973.
15. Hershey, J. W. B., and W. C. Merrick. 2000. The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, p. 33–88. *In* N. Sonenberg, J. W. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
16. Hua, Y., and J. Zhou. 2004. Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**:268–276.
17. Kaufman, R. J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**:1211–1233.
18. Kedersha, N., and P. Anderson. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:963–969.
19. Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 $\alpha$  to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**:1431–1442.
20. Kimball, S. R., R. L. Horetsky, D. Ron, L. S. Jefferson, and H. P. Harding. 2003. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**:C273–C284.
21. López, T., M. Camacho, M. Zayas, R. Najera, R. Sanchez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* **79**:184–192.
22. López, T., M. Rojas, C. Ayala-Breton, S. Lopez, and C. F. Arias. 2005. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J. Gen. Virol.* **86**:1609–1617.
23. Mazroui, R., R. Sukarieh, M. E. Bordeleau, R. J. Kaufman, P. Northcote, J. Tanaka, I. Gallouzi, and J. Pelletier. 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **17**:4212–4219.
24. McEwen, E., N. Kedersha, B. Song, D. Scheuner, N. Gilks, A. Han, J. J. Chen, P. Anderson, and R. J. Kaufman. 2005. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J. Biol. Chem.* **280**:16925–16933.
25. McInerney, G. M., N. L. Kedersha, R. J. Kaufman, P. Anderson, and P. Liljestrom. 2005. Importance of eIF2 $\alpha$  phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell* **16**:3753–3763.
26. Montero, H., C. F. Arias, and S. Lopez. 2006. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* **80**:9031–9038.
27. Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez. 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200.
28. Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:565–572.
29. Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol, and C. U. Hellen. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:7029–7036.
30. Piron, M., P. Vende, J. Cohen, and D. Poncet. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**:5811–5821.
31. Poncet, D. 2003. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell, p. 185–205. *In* U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*, Amsterdam, The Netherlands.
32. Prostko, C. R., M. A. Brostrom, E. M. Malara, and C. O. Brostrom. 1992. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 $\alpha$  and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78. *J. Biol. Chem.* **267**:16751–16754.
33. Proud, C. G. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**:3–12.
34. Raaben, M., M. J. Koerkamp, P. J. Rottier, and C. A. de Haan. 2007. Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell Microbiol.* **9**:2218–2229.
35. Scheuner, D., B. Song, E. McEwen, C. Liu, R. Laybutt, P. Gillespie, T. Saunders, S. Bonner-Weir, and R. J. Kaufman. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell* **7**:1165–1176.
36. Schneider, R. J., and I. Mohr. 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* **28**:130–136.
37. Silvestri, L. S., Z. F. Taraporewala, and J. T. Patton. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J. Virol.* **78**:7763–7774.
38. Smith, J. A., S. C. Schmechel, A. Raghavan, M. Abelson, C. Reilly, M. G. Katze, R. J. Kaufman, P. R. Bohjanen, and L. A. Schiff. 2006. Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* **80**:2019–2033.
39. Tourrière, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J. M. Blanchard, E. Bertrand, and J. Tazi. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* **160**:823–831.
40. Ventoso, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco, and M. Esteban. 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 $\alpha$  phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* **20**:87–100.
41. Wek, R. C., H. Y. Jiang, and T. G. Anthony. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:7–11.

# Protein Kinase R Is the Kinase Responsible for the Phosphorylation of eIF2 $\alpha$ in Rotavirus Infection<sup>∇</sup>

Margarito Rojas, Carlos F. Arias, and Susana Lopez\*

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

Received 23 March 2010/Accepted 7 July 2010

The eukaryotic initiation translation factor 2 (eIF2) represents a key point in the regulation of protein synthesis. This factor delivers the initiator Met-tRNA to the ribosome, a process that is conserved in all eukaryotic cells. Many types of stress reduce global translation by triggering the phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eIF2, which reduces the formation of the preinitiation translation complexes. Early during rotavirus infection, eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated, and even under these conditions viral protein synthesis is not affected, while most of the cell protein synthesis is blocked. Here, we found that the kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in rotavirus-infected cells is PKR, since in mouse embryonic fibroblasts deficient in the kinase domain of PKR, or in MA104 cells where the expression of PKR was knocked down by RNA interference, eIF2 $\alpha$  was not phosphorylated upon rotavirus infection. The viral component responsible for the activation of PKR seems to be viral double-stranded RNA, which is found in the cytoplasm of infected cells, outside viroplasms. Taken together, these results suggest that rotaviruses induce the PKR branch of the interferon system and have evolved a mechanism to translate its proteins, surpassing the block imposed by eIF2 $\alpha$  phosphorylation.

**Fn1** Protein translation is the final step in the flow of genetic information, and unlike transcriptional control, regulation at this step allows for an immediate and rapid response to changes in physiological conditions. While every step of the translation process is amenable to regulation, under most circumstances mRNA translation is regulated primarily at the level of initiation (5). The translation of eukaryotic mRNAs involves the recognition and recruitment of mRNAs by the translation initiation machinery and the assembly of the 80S ribosome on the mRNA; this process is mediated by the eukaryotic initiation factors (eIFs). Translation initiation is a complex process that begins with the recognition of the cap nucleotide structure (m<sup>7</sup>GpppN) at the 5' end of mRNAs by the cap-binding protein eIF4E that is part of the cap-binding complex eIF4F. This complex is composed of eIF4E, eIF4A (an ATP-dependent RNA helicase), and the scaffolding protein eIF4G. The binding of Met-tRNA to the 40S ribosomal subunit is mediated by a ternary complex composed of eIF2-GTP-Met-tRNA. The binding of GTP to eIF2 is the rate-limiting step in the assembly of the ternary complex and is regulated by eIF2B. Once the 40S ribosomal subunit is bound to the mRNA, it is thought to scan the mRNA in the 5' to 3' direction (26). The joining of the 40S and 60S ribosomal subunits to form an 80S initiation complex then takes place. The release of eIFs is assisted by eIF5, which facilitates the hydrolysis of GTP carried out by eIF2. The GDP on eIF2 is exchanged for GTP by eIF2B in a regulated manner that is essential for ensuing rounds of initiation (25).

Many types of stresses reduce global translation by trigger-

ing the phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) at residue Ser51. This phosphorylation inhibits the exchange of GDP for GTP catalyzed by eIF2B, which then is sequestered in a complex with eIF2. Since the cellular level of eIF2B is 10 to 20 times lower than the level of eIF2, even small changes in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  have a drastic effect on protein translation. Four protein kinases are known to phosphorylate eIF2 $\alpha$  at residue Ser51: the heme-regulated inhibitor kinase (HRI), which is activated by heme deficiency, treatment with arsenite, or heat shock; protein kinase R (PKR), which is activated by double-stranded RNA (dsRNA); PKR-like ER kinase (PERK), which is activated in response to endoplasmic reticulum (ER) stress; and the general control nonderepressible-2 (GCN2) kinase, activated in response to amino acid starvation (29). These kinases serve to arrest translation upon different conditions that threaten cell survival, such as viral infection, nutrient deprivation, and misfolded proteins.

Rotaviruses are the leading etiologic agents of severe diarrheal disease in infants and young children, being responsible for an estimated incidence of 600,000 annual deaths globally and placing a significant economic burden on the global health care system (22). These viruses have a genome composed of 11 segments of dsRNA enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. During or shortly after cell entry, the infecting virus uncoats, letting loose the two surface proteins and yielding a double-layered particle (DLP) that is transcriptionally active. The viral transcripts direct the synthesis of six structural (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural (NSP1 to NSP6) proteins (6). Once a critical mass of viral proteins is synthesized, 3 to 4 h postinfection they start to accumulate into discrete, cytoplasmic inclusions termed viroplasms, where the replication of the virus genome (39) and the assembly of DLPs take place (6).

Early in the infection process the virus takes over the host

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

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 14 July 2010.



translation machinery, causing a shut off of cell protein synthesis. The viral mRNAs contain 5'-methylated cap structures but lack the poly(A) tails characteristic of most cellular mRNAs. Instead, rotavirus mRNAs have at their 3' end a consensus sequence (UGACC) that is conserved in all 11 viral genes (28). The rotavirus nonstructural protein NSP3 binds, through its amino-terminal domain, to this consensus sequence. NSP3 also binds, through its carboxy-terminal domain, to eIF4GI in the same region as that used by the poly(A) binding protein (PABP), but with higher affinity; thus, it was proposed that during rotavirus infection NSP3 evicts PABP from eIF4GI, impairing the translation of cellular mRNAs, while leading to the enhancement of the translation of rotaviral mRNAs (27, 28). We recently found that while NSP3 indeed inhibits the translation of cellular mRNAs, this nonstructural protein is not needed for the translation of viral mRNAs (17). The virus-induced inhibition of cell protein synthesis also seems to be mediated by a second mechanism, since eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated early after infection and is maintained in this state throughout the virus replication cycle (18). The continuous phosphorylated status of eIF2 $\alpha$  might be beneficial for the virus, since under these conditions the viral mRNAs are efficiently translated, while the synthesis of most, but not all, cellular proteins stops.

In this work, we found that during rotavirus infection there is a significant amount of viral dsRNA in the cytoplasm, which apparently is responsible for PKR activation, eIF2 $\alpha$  phosphorylation, and the modification of the cellular translation machinery. Most probably, the cellular response to rotavirus dsRNA is aimed to block the infection, but this virus has evolved a mechanism that subverts this response, since viral proteins are efficiently synthesized under these conditions. Also, we found that in rotavirus-infected cells the phosphorylated form of eIF2 $\alpha$  and PKR cosedimented with the 40S ribosomal subunits. These changes in the translation initiation complexes suggest that rotavirus induces a remodeling of the host translation machinery. These results were reproduced by transfecting MA104 cells with purified rotavirus dsRNA or synthetic dsRNA [poly(I:C)], suggesting that these changes form part of an integral cellular response to dsRNA.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells, viruses, and antibodies.** The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in advanced medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM]) (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 4% fetal bovine serum (FBS). Wild-type (wt) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and MEFs expressing S51A mutant eIF2 $\alpha$  (S51A) were obtained from N. Sonenberg, McGill University, Montreal, Canada. Isogenic PKR<sup>+/+</sup> and catalytic PKR<sup>-/-</sup> MEFs, previously described (41), were obtained from A. E. Koromilas, McGill University, Montreal, Canada. Isogenic PERK<sup>+/+</sup> and PERK<sup>-/-</sup> MEFs (11) were obtained from D. Ron, New York University. MEFs were grown in high-glucose DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and nonessential amino acids (Invitrogen, Carlsbad, CA). Rhesus rotavirus RRV was obtained from H. B. Greenberg, Stanford University. The virus was propagated in MA104 cells as described previously (21). Rotavirus lysates were activated with trypsin (10  $\mu$ g/ml; Gibco BRL) for 30 min at 37°C. The antibodies used were rabbit anti-phospho-eIF2 $\alpha$ , rabbit anti-eIF2 $\alpha$ , mouse anti-S6 ribosomal protein (54D2), and rabbit anti-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) from Cell Signaling (Boston, MA); mouse anti-eIF2A (MO1) from Abnova (Taiwan); mouse anti-eIF2Be (B-7) and mouse anti-PKR (B-10) from Santa Cruz (Santa Cruz, CA); and mouse anti-dsRNA (J2) from Scicons (Hungary). Rabbit polyclonal serum to NSP5 has been described previously (9). The secondary antibodies used were horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit

polyclonal antibody (Perkin Elmer), horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Zymed, Carlsbad, CA), goat anti-mouse coupled to Alexa 568 or 488, and goat-anti-rabbit coupled to Alexa 488 or 568 (Molecular Probes, Eugene, OR).

**Viral infection and titration of viral progeny.** MEFs seeded in gelatin-coated 96-well plates were washed twice with minimal essential medium (MEM), and serial dilutions of the RRV viral lysate were adsorbed to cells for 60 min at 37°C. After the adsorption period, virus inoculum was removed, cells were washed twice with MEM, and the infection was left to proceed for 14 to 16 h at 37°C. The infectious titer was obtained by an immunoperoxidase focus assay as described previously (21). To determine the yield of viral progeny produced in the different cell lines used, MEFs in gelatin-coated 48-well plates were infected with RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 3 as described above, 14 to 16 h postinfection (hpi) cells were lysed by two freeze-thaw cycles, and the lysates were treated with 10  $\mu$ g trypsin/ml for 30 min at 37°C. The infectious titer of these viral lysates was obtained by infecting monolayers of MA104 cells as described above.

**Rotavirus DLPs and dsRNA purification.** MA104 cells grown in 150-cm<sup>2</sup> flasks were infected as described previously and were harvested until complete cytopathic effect was attained, the viral lysates were freeze-thawed twice, and viral particles were concentrated by centrifugation for 1 h at 30,000 rpm at 4°C in an SW40 rotor (Beckman, Fullerton, CA). The viral pellet was resuspended in TNC buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>), sonicated once for 20 s, extracted with Genetron (trichloro-monofluoro-ethane), and used to obtain genomic viral dsRNA or DLPs. To obtain the 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 an SW40 rotor, and viral dsRNA was isolated from the pellet by two extractions with phenol-chloroform.

To prepare rotavirus DLPs, CsCl was added to the aqueous phase obtained from the Genetron extraction to obtain a density of 1.36 g/cm<sup>3</sup>; the mixture was centrifuged for 18 h at 35,000 rpm in an SW40Ti rotor; and the opalescent bands corresponding to TLPs and DLPs were collected by puncture, mixed, and concentrated by centrifugation for 1 h at 40,000 rpm in an SW40 rotor. The pellet was resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and treated with 3 mM EGTA for 15 min at 37°C to remove the outer layer of the particles, and the sample then was diluted with TNC buffer and pelleted as described above.

**Transfections.** The short interfering RNA (siRNA) for PKR was obtained from Ambion, Inc. (Austin, TX). The transfection mixture containing Oligofectamine (15  $\mu$ l/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200 pmol/ml of the siRNA was added to wells of 48-well plates and incubated for 20 min at room temperature. After this period, cells ( $4 \times 10^4$  cells/well) were seeded over the transfection mixture and incubated for 72 h at 37°C. Cells then were infected at an MOI of 3.

For RNA transfections, MA104 cells seeded in 48-well plates or in 15-cm<sup>2</sup> plates were incubated for 1 h at 37°C with a mixture of Lipofectamine (40  $\mu$ g/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) and purified viral dsRNA (10  $\mu$ g/ml), poly(I:C) (5  $\mu$ g/ml) (Sigma Aldrich Co, St. Louis MO.), or rotavirus gene 10 mRNA (10  $\mu$ g/ml), prepared as previously described (1). The transfection mixture was replaced by MEM, and cells were incubated for different times before being harvested. To lipofect DLPs, viral particles were diluted in MEM at 5  $\mu$ g/ml, and Lipofectamine (40  $\mu$ g/ml) was added. After 30 min of incubation at room temperature, 100  $\mu$ l of the transfection mixture was added to cell monolayers for 1 h at 37°C. The lipofection mixture was removed and replaced by MEM, and cells were incubated for the indicated times.

**Radiolabeling of proteins.** For protein labeling, cells grown in 48-well plates were left uninfected or were infected with rotavirus at an MOI of 3. Before harvest, the medium was replaced by MEM without methionine, supplemented with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy-tag express-<sup>35</sup>S labeling mix (Dupont NEN, Boston, MA), and incubated for 30 min at 37°C. Cells were lysed as indicated below, and samples were resolved by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by autoradiography.

**Immunoblot analysis.** Cells were incubated for 15 min at 4°C in lysis buffer (25 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM Tris [pH 7.4], 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol [DTT], 10% glycerol, and 1% Triton X-100) and supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free; Roche, Indianapolis, IN). The lysates were centrifuged for 5 min at 13,000 rpm, and the supernatants were collected. Samples were diluted in Laemmli sample buffer, denatured by being boiled for 5 min, subjected to 10% SDS-PAGE, and transferred to Immobilon NC membranes (Millipore, Billerica, MA). After treatment with blocking solution (5% bovine serum albumin [BSA], 0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline [PBS], overnight at 4°C), the membranes were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution for 12 to 24 h at 4°C. The membranes were rinsed with PBS-Tween 20, and bound antibodies

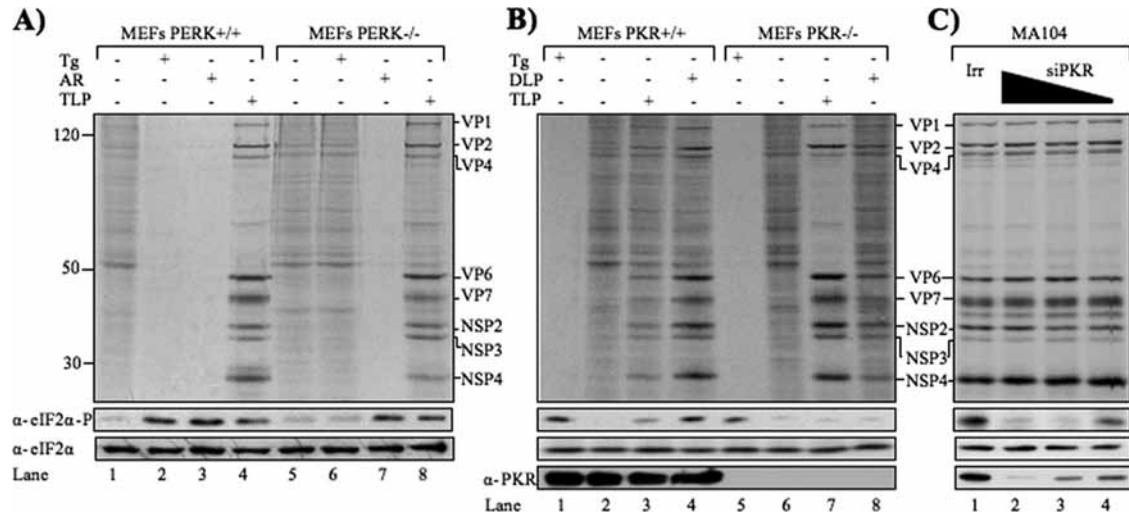


FIG. 1. Kinase PKR phosphorylates eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection. wt (+/+) or mutant (-/-) mouse embryonic fibroblasts (MEFs), lacking either PERK (A) or PKR (B) kinase activity, were infected with triple-layered particles (TLP) of rotavirus strain RRV at an MOI of 3 or were transfected with rotavirus double-layered particles (DLP) during 1 h, and they were harvested at 8 h postinfection (hpi) or posttransfection. As a control for eIF2 $\alpha$  phosphorylation, the cells were treated with 1  $\mu$ M thapsigargin (Tg) or 100  $\mu$ M sodium arsenite (AR) for 1 h. (C) MA104 cells were transfected with an siRNA to GFP (Irr) or with increasing amounts (100 to 400 pm/ml) of an siRNA directed to PKR; 72 h posttransfection the cells were infected with RRV at an MOI of 3, and 8 hpi the cells were lysed. Thirty min before being harvested, the cells were metabolically labeled with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy-tag express-[<sup>35</sup>S] (maintaining the thapsigargin or sodium arsenite treatment during the labeling period). The labeled proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography. In parallel, the same samples were analyzed by Western blotting using antibody against PKR ( $\alpha$ -PKR), phospho-eIF2 $\alpha$  ( $\alpha$ -eIF2 $\alpha$ -P), or total eIF2 $\alpha$  ( $\alpha$ -eIF2 $\alpha$ ).

were developed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody and the Western Lightning system (Perkin Elmer, MA).

**Immunofluorescence.** Cells grown on coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and washed four times with washing buffer (50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS). Fixed cells were permeabilized by incubation in washing buffer supplemented with 0.5% Triton X-100 and 5% of BSA for 15 min and then were treated with blocking solution (5% BSA–50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS) at 4°C overnight. The coverslips then were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution for 1 h at room temperature, followed by incubation with the corresponding secondary antibody for 1 h at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Fluoromount (Argene, France). The slides were analyzed with an E600 epifluorescence microscope coupled to a DXM1200 digital still camera (Nikon).

**RNase treatments.** The RNase III coding sequence was amplified by PCR from *Escherichia coli* strain K-12 by following the protocol described by Yang et al. (44), and the PCR product was cloned in plasmid pGEX-4T1 using standard recombination techniques. The recombinant glutathione S-transferase (GST)-RNase III was purified by affinity chromatography (AKTA, GE Healthcare) as reported previously (10). RNase A was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). For *in situ* digestions, cells grown on coverslips and transfected or infected as indicated were fixed and permeabilized as described above and were incubated for 2 h at 37°C with RNase III (2  $\mu$ g/ml) in reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, pH 7.9, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 5% glycerol) or with RNase A (1  $\mu$ g/ml) in PBS. After the incubation period, the cells were washed 10 times with washing buffer and processed for immunofluorescence as described above. For *in vitro* digestions, CsCl-purified TLPs or DLPs or purified rotavirus dsRNA were incubated with RNase III (2  $\mu$ g/ml) in reaction buffer or with RNase A (1  $\mu$ g/ml) in PBS for 2 h at 37°C. The viral RNA was purified by two extractions with phenol-chloroform, ethanol precipitated, and analyzed by PAGE and silver staining as previously described (14).

**Sucrose gradient polysome profiles.** Cells seeded in 15-cm<sup>2</sup> plates were left uninfected or were infected with rotavirus or transfected with rotavirus genomic dsRNA or poly(I:C) for 1 h, and then they were incubated in serum-free medium at 37°C for 6 h. Three minutes before harvest, cycloheximide (100  $\mu$ g/ml) was added to cells. The cells were washed three times with ice-cold buffer A (20 mM Tris, pH 7.8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/ml cycloheximide) and then lysed with buffer A supplemented with 1 mg/ml heparin, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton X-100, 25 mM NaF, 1 mM OvNa, Complete EDTA-free (Roche, Indianapolis, IN), and RNasin (80 U/ml) (Promega, Madison, WI); the plates were

kept on ice at all times. After clarification (10,000  $\times$  g for 15 min at 4°C), the supernatants were layered onto discontinuous sucrose gradients (10 to 50%) and subjected to centrifugation (36,000 rpm for 2 h in a SW-40 rotor). Gradients were fractionated (Amersham AktaPrime UV monitor at an optical density of 254 nm [OD<sub>254</sub>]), collecting 22 fractions/gradient. RNA was isolated from each fraction by phenol-chloroform extraction, and the proteins in the selected fractions were concentrated by methanol-chloroform precipitation.

## RESULTS

**Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection is mediated by the kinase PKR.** We have shown that during rotavirus infection, the initiation factor eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated and remains as such throughout the replication cycle of the virus. However, the kinase responsible for this phosphorylation has not been identified (18). Since part of the morphogenesis of rotavirus takes place in the ER, and given the dsRNA nature of the rotaviral genome (6, 24), the two kinases that most likely become activated during rotavirus infection are PERK and PKR. To determine if either of these two kinases phosphorylates eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from PERK or PKR knockout mice (PERK<sup>-/-</sup> or PKR<sup>-/-</sup>), and wild-type MEFs (PERK<sup>+/+</sup> or PKR<sup>+/+</sup>) with genetic backgrounds identical to those of their respective knockout MEFs (11, 41), were infected with simian rotavirus strain RRV, and the viral protein synthesis and the yield of infectious virus were analyzed in these cells.

Both PERK<sup>+/+</sup> and PERK<sup>-/-</sup> MEFs were susceptible to rotavirus infection, as judged by the similar rates of protein synthesis observed in both cell lines (Fig. 1A, lanes 4 and 8). When the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was assessed by Western blotting, we found that the factor became phosphorylated in both types of MEFs when infected with rotavirus but not in

uninfected cells, suggesting that this kinase is not responsible for the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection. The eIF2 $\alpha$  phosphorylation phenotype of these MEFs was demonstrated by treating cells with thapsigargin, a known PERK inducer, and with sodium arsenite, which mainly induces the HRI kinase. As expected, the treatment with sodium arsenite induced the phosphorylation of the factor in both PERK<sup>+/+</sup> and PERK<sup>-/-</sup> MEFs, which correlated with the shutting off of cellular protein synthesis, while when treated with thapsigargin, eIF2 $\alpha$  was phosphorylated only in the PERK<sup>+/+</sup> MEFs but not in the PERK<sup>-/-</sup> MEFs, indicating the lack of PERK activity in the mutant cells (Fig. 1A).

Similarly, to establish whether PKR was the kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection, PKR<sup>+/+</sup> or PKR<sup>-/-</sup> MEFs were left uninfected or were infected with rotavirus. In this case, the infection of mutant PKR<sup>-/-</sup> MEFs resulted in an effective infection, as judged by the amount of viral proteins synthesized (Fig. 1B, lane 7), as well as by the yield of viral progeny produced; however, in these cells eIF2 $\alpha$  was not phosphorylated. Unexpectedly, the wild-type PKR<sup>+/+</sup> MEFs appeared to be less susceptible to the infection, since they produced smaller amounts of viral protein when infected with complete, triple-layered particles (TLPs), and consequently the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation was reduced (Fig. 1B, lane 3). Since the infection in PKR<sup>+/+</sup> and PKR<sup>-/-</sup> MEFs was very different, it was difficult to compare both wt and mutant cells directly. To overcome this problem, instead of infecting the cells with TLPs, RRV double-layered particles (DLPs) were transfected into both types of cells. Using this strategy, the PKR<sup>+/+</sup> MEFs were more efficiently infected, resulting in a larger production of viral proteins and in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  (Fig. 1B, lane 4). In clear contrast, during the infection or transfection of rotavirus particles into PKR<sup>-/-</sup> MEFs, eIF2 $\alpha$  was not phosphorylated (Fig. 1B, lanes 7 and 8). As in the case of the PERK MEFs, the phenotype of these cells was further confirmed by detecting the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  when the cells were treated with thapsigargin; in this case, eIF2 $\alpha$  appeared phosphorylated in both MEFs. Also, the presence of PKR was detected by Western blotting. As expected, the complete protein was present only in the PKR<sup>+/+</sup> MEFs, since their mutant counterparts produce a truncated PKR protein that lacks the kinase domain (41). These data suggest that the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection is most likely the result of the activity of PKR. To further confirm this observation using an alternative approach, we silenced the expression of PKR using RNA interference (RNAi). In this case, MA104 cells (the cell line of choice to grow rotavirus) were transfected with different amounts of an siRNA directed to PKR or with a control, irrelevant siRNA directed against green fluorescent protein (GFP). The cells were infected 72 h after transfection with the siRNAs, and 8 hpi the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  and the presence of PKR were evaluated by Western blotting, and the synthesis of viral proteins was estimated by autoradiography. A reduction in the amount of PKR present in the transfected cells was found, which correlated with the amount of siRNA transfected (Fig. 1C, lanes 2 to 4). The reduction of PKR also correlated with a decrease in the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, but it did not have an effect in the synthesis of viral proteins, confirming again that the phosphorylation of

eIF2 $\alpha$  during the infection with rotavirus is caused by PKR and is not required for viral protein synthesis.

**Double-stranded RNA is the trigger that induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in rotavirus-infected cells.** To determine the viral component responsible for the activation of PKR during the replicative cycle of the virus, MA104 cells were infected or transfected with infectious or UV-psoralen-inactivated rotavirus (i-RRV), and the activation of PKR was indirectly analyzed through the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . Since the transfection of viral particles overcomes the process of virus entry, we also were able to evaluate the role of this process in the induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation. When the inactivated rotavirus particles either were used for infection or were transfected into the cells, there was no viral protein synthesis or induction of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, in contrast with cells infected or transfected with the infectious virus, where the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was clear (Fig. 2A). These results suggest that the viral entry process does not have a role in the activation of PKR, and that a *de novo*-synthesized viral component might be responsible for triggering the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .

Since the most likely candidate to activate PKR was the viral dsRNA produced during the infection, we evaluated this possibility by transfecting MA104 cells with purified rotavirus genomic dsRNA and analyzed the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation and the cellular protein synthesis at different times posttransfection (Fig. 2B). In cells transfected with dsRNA, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was apparent by 2 h (Fig. 2B), and similarly to rotavirus infection (18), this factor remained phosphorylated up to 8 h posttransfection, which correlated with the almost-complete shut off of cellular protein synthesis, as judged by the poor synthesis of S<sup>35</sup>-labeled proteins (Fig. 2B). To make sure that the observed effect was due to viral dsRNA and not to a possible contamination of the RNA preparation with a small amount of infectious virus, we looked for the synthesis of viral proteins by Western blotting in cells transfected with the dsRNA. We were not able to detect the presence of viral proteins under this condition (not shown). In addition, transfecting cells with poly(I:C), a well-characterized molecule known to induce PKR, reproduced the results obtained with the transfected viral dsRNA (Fig. 2C).

It is known that rotavirus RNA replication occurs concurrently with the packaging of the genome into newly formed viral cores (23), which suggests that there is no genomic dsRNA in the cell's cytoplasm, outside viroplasm, to activate PKR; however, our results indicate the presence of dsRNA in the cytoplasm during rotavirus infection that could be responsible for the activation of this kinase. To examine this possibility, MA104 cells were infected with RRV or transfected with poly(I:C) and immunostained with a monoclonal antibody (MAb), J2, that specifically recognizes dsRNA stretches that are >40 bp in length (36). As reported previously (43), poly(I:C)-transfected cells showed a strong immunofluorescent signal scattered in the cytoplasm that was not present in nontransfected cells (Fig. 2D). In cells infected with rotavirus, we also observed a strong signal indicative of the presence of dsRNA (Fig. 2D). Interestingly, some of the dsRNA fluorescent signal was found to colocalize with viroplasm, but most of it was found scattered in the cytoplasm. The dsRNA signal observed in rotavirus-infected cells increased with time after infection,

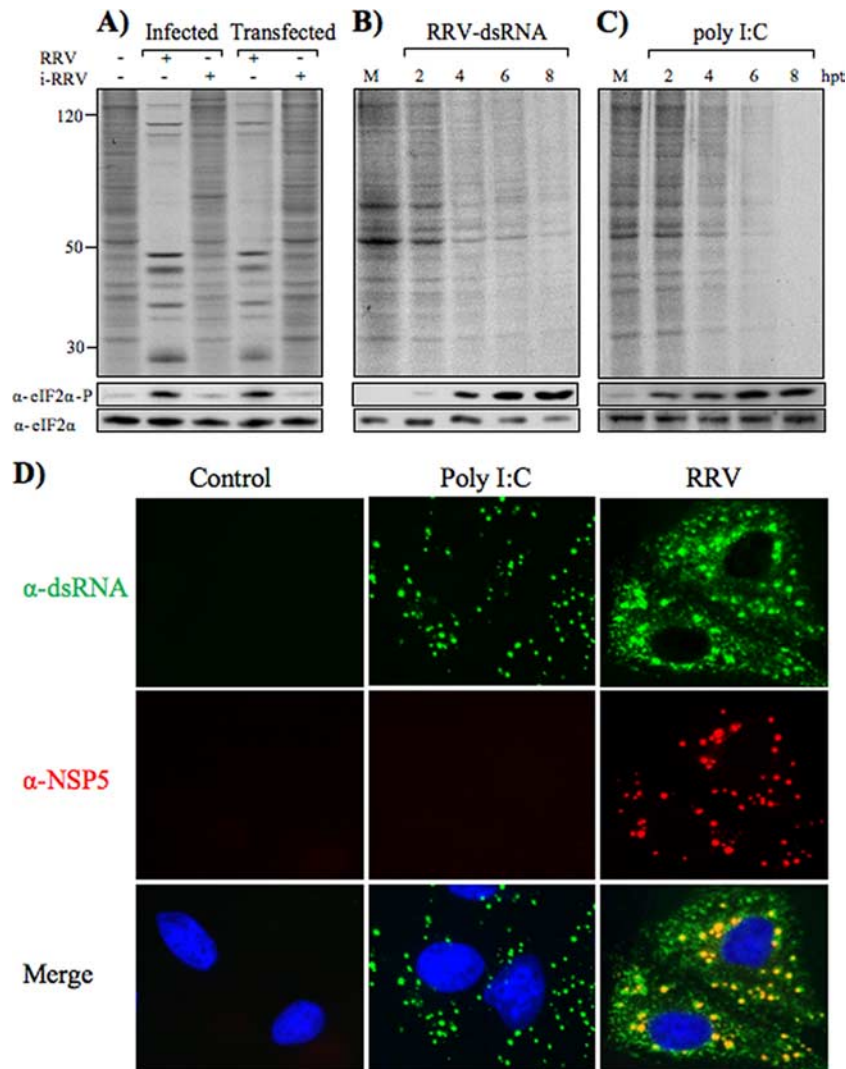


FIG. 2. Rotavirus dsRNA triggers eIF2 $\alpha$  phosphorylation. (A) MA104 cells were infected or transfected with infectious (RRV) or UV psoralen-inactivated (i-RRV) rotavirus at an MOI of 3 during 1 h at 37°C. Eight hours postinfection or posttransfection (hpt), the cells were harvested. (B and C) MA104 cells were transfected or left untransfected (M) during 1 h with 10  $\mu$ g/ml of purified rotavirus dsRNA or 5  $\mu$ g/ml of poly(I:C), and they were harvested at the indicated hours posttransfection. Thirty min before being harvested, the cells were metabolically labeled with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy-tag express- $^{35}$ S]. The labeled proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography. In parallel, the same samples were analyzed by Western blotting using antibodies against phospho-eIF2 $\alpha$  ( $\alpha$ -eIF2 $\alpha$ -P) or total eIF2 $\alpha$  ( $\alpha$ -eIF2 $\alpha$ ). (D) MA104 cells were transfected or left untransfected during 1 h with 5  $\mu$ g/ml of poly(I:C) or were infected with rotavirus RRV at an MOI of 3. After an incubation period of 8 h, the cells were fixed and stained with the mouse monoclonal antibody J2 to dsRNA ( $\alpha$ -dsRNA) (green) and the polyclonal antibody to NSP5 ( $\alpha$ -NSP5) (red) as primary antibodies, followed by incubation with goat-anti-mouse immunoglobulin G coupled to Alexa 488 and goat-anti-rabbit immunoglobulin G coupled to Alexa 568 as secondary antibodies, respectively. The cell nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; in blue).

as opposed to the signal in poly(I:C)-transfected cells, which remained constant over time (results not shown). Taken together, these results suggest that dsRNA stretches longer than 40 bp in length produced during the infection cycle trigger the activation of PKR with the consequent phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .

**RNase sensitivity data suggest that dsRNA is present in the cytoplasm of infected cells.** The dsRNA detected by MAb J2 in the cytoplasm of rotavirus-infected cells but outside viroplasm could be either genomic dsRNA or structured viral mRNA, as has been described previously for positive RNA and DNA virus-infected cells (43). To determine the nature of the

dsRNA recognized by MAb J2, cells were transfected with *in vitro*-transcribed rotavirus gene 10 mRNA or purified viral dsRNA or were infected with RRV. At 8 h posttransfection or infection, the cells were fixed, permeabilized, and treated with either *E. coli* RNase III, known to cleave dsRNA (19), or with pancreatic RNase A, which cleaves single-stranded RNA (31). After an incubation period of 2 h, the cells were extensively washed and processed for immunofluorescence staining with the J2 antibody or with an anti-NSP5 antibody, as indicated (Fig. 3). We found that cells transfected with either mRNA or dsRNA gave a positive signal with the J2 antibody, which disappeared when the cells were treated with RNase A or with

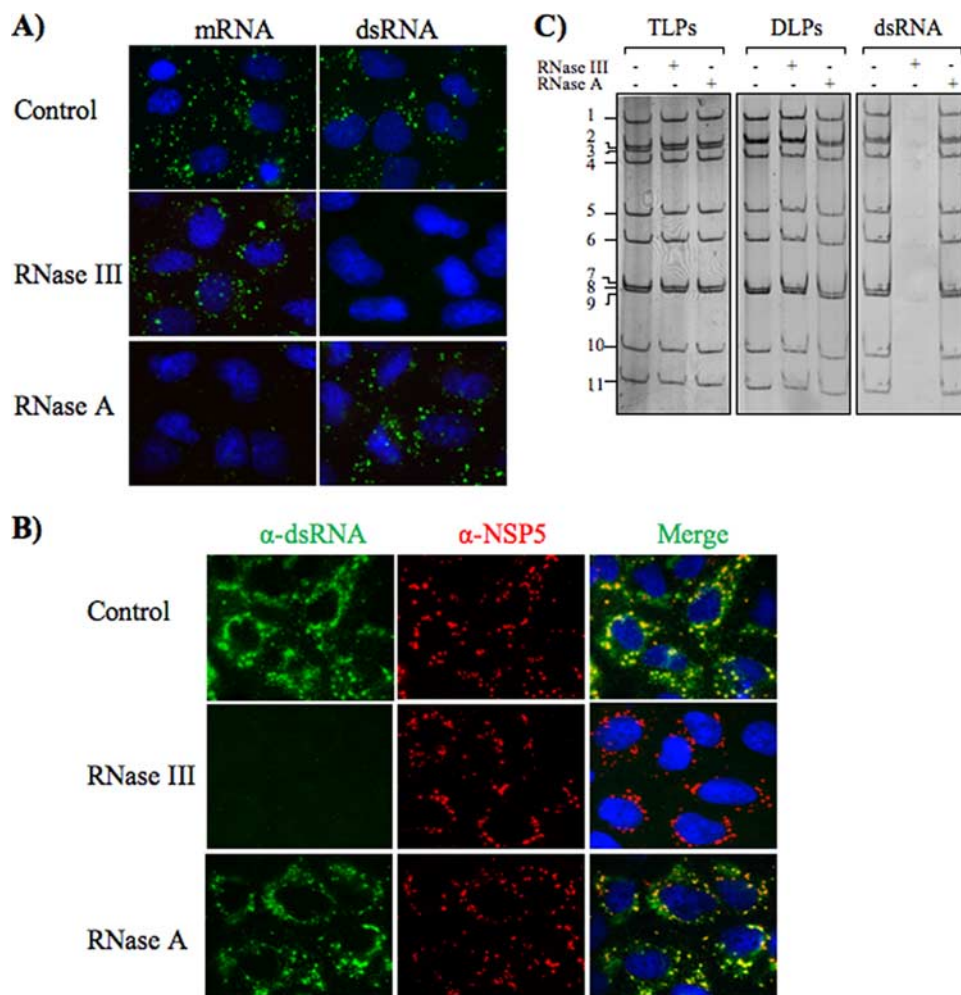


FIG. 3. RNA present in the cytoplasm of infected cells is viral dsRNA. (A) MA104 cells were transfected for 1 h with 10  $\mu\text{g/ml}$  of purified rotavirus dsRNA or 10  $\mu\text{g/ml}$  of rotavirus gene 10 mRNA or (B) were infected with rotavirus RRV at an MOI of 3. Eight hours posttransfection or postinfection, the cells were fixed, permeabilized, and treated with 2  $\mu\text{g/ml}$  of RNase III or 1  $\mu\text{g/ml}$  of RNase A for 2 h at 37°C. After extensive washes, the cells were stained with MAb J2 to dsRNA ( $\alpha$ -dsRNA) (green) and with a polyclonal antibody to NSP5 ( $\alpha$ -NSP5) (red) as primary antibodies, followed by incubation with goat anti-mouse immunoglobulin G coupled to Alexa 488 and goat anti-rabbit immunoglobulin G coupled to Alexa 568 as secondary antibodies, respectively. The cell nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; in blue). (C) CsCl-purified TLPs and DLPs or rotavirus dsRNA were incubated with RNase III or RNase A as indicated above for 2 h at 37°C. The genomic dsRNA was phenol extracted and analyzed by PAGE and silver staining as described in Materials and Methods.

RNase III, respectively (Fig. 3A). When cells infected with rotavirus were treated with these two RNases, we found that the signal of the J2 antibody disappeared only when the cells were treated with RNase III but not with RNase A (Fig. 3C). To discard the possibility that the dsRNA present in viral particles was accessible to RNase III digestion, we treated CsCl-purified DLPs or TLPs, or purified viral dsRNA, with both RNases, and after an incubation period of 2 h the RNA in each sample was phenol extracted and analyzed by PAGE and silver staining. Figure 3B shows that the RNA present in viral particles (TLPs or DLPs) was not susceptible to RNase treatment, while the purified dsRNA was degraded only by RNase III. These results suggest that the nature of the RNA stained by J2 in rotavirus-infected cells is dsRNA, most probably genomic viral dsRNA.

**The synthesis of rotavirus proteins does not depend on the GADD34/PP1 phosphatase complex.** As previously shown, dur-

ing rotavirus infection eIF2 $\alpha$  becomes phosphorylated, and it remains in this state during the infection, yet the synthesis of the viral proteins is not affected (18). Since the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  at a given time is the result of the equilibrium between the activities of the kinase(s)/phosphatase(s) involved, one possibility to explain this observation is that during infection there are fast and/or localized events of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation that allow viral protein synthesis. Generally, under stress conditions mammalian cells express a protein known as growth arrest and DNA damage protein-34 (GADD34) that forms a complex with phosphatase PP1, which specifically promotes the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  on Ser51 (20). To evaluate if the phosphatase activity of the GADD34/PP1 complex was important during rotavirus infection, we tested the effect of salubrinal, a selective inhibitor of the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  by the GADD34/PP1 complex (4), with the idea that if during infection the phosphatase activity of

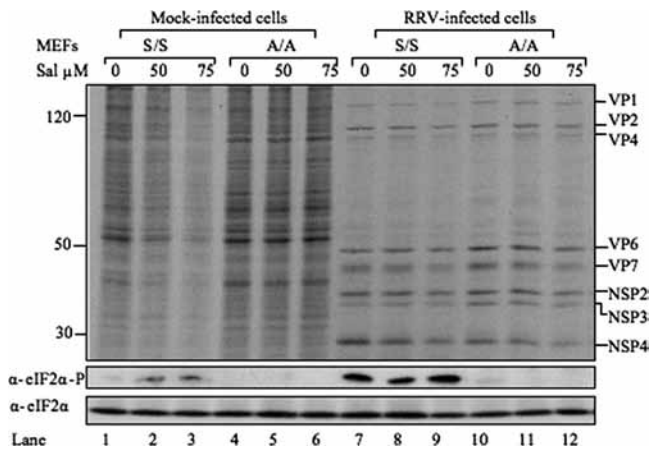


FIG. 4. Rotavirus protein synthesis is resistant to the inhibition of the GADD34/PP1 complex. Wild-type (S/S) or mutant (A/A) MEFs, which express a nonphosphorylatable form of eIF2 $\alpha$ , were left uninfected or were infected with rotavirus RRV at an MOI of 3, and 1 h postinfection they were incubated with the indicated doses of salubrinal (sal) and harvested at 8 hpi. Thirty min before being harvested, the cells were metabolically labeled with 25  $\mu$ Ci/ml Easy-tag express- $^{35}$ S] (maintaining the drug during the labeling period). The labeled proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography, and in parallel the same samples were analyzed by Western blotting using antibodies against phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P) or total eIF2 $\alpha$ .

the complex was necessary for the translation of viral proteins, its inhibition would result in a decreased viral protein synthesis. In these assays we used mouse embryonic fibroblasts with wild-type eIF2 $\alpha$  (MEF eIF2 $\alpha$  S/S) or a mutant in which serine 51 of eIF2 $\alpha$  was changed to alanine (MEF eIF2 $\alpha$  A/A), thus it cannot be phosphorylated. These cells were left uninfected or were infected with the rotavirus RRV, and after the adsorption period the cells were treated with different concentrations of salubrinal. Eight hours postinfection the synthesis of cellular and viral proteins was analyzed by autoradiography, and the phosphorylation level of eIF2 $\alpha$  was analyzed by Western blotting (Fig. 4). In mock-infected eIF2 $\alpha$  S/S MEFs, salubrinal caused the accumulation of eIF2 $\alpha$  in its phosphorylated state in a dose-dependent manner, which correlated with a decrease in the synthesis of cellular protein. It has been shown previously that this phenomenon is due to the inhibition of GADD34/PP1 complex and not to the activation of the eIF2 $\alpha$  kinases (4). As expected, the protein synthesis in eIF2 $\alpha$  A/A MEFs was not affected by treatment with salubrinal (Fig. 4). On the other hand, when either wt or mutant MEFs were infected with rotavirus, we found that the inhibition of the GADD34/PP1 complex did not affect the synthesis of viral proteins either in the eIF2 $\alpha$  A/A MEFs or in their wild-type counterparts, suggesting that viral mRNAs are translated through a mechanism that is less sensitive to the effects of salubrinal and that they overcome the blockage imposed by the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .

**Phosphorylated eIF2 $\alpha$  and PKR are associated with 40S ribosomal subunits during rotavirus infection.** Since viral protein synthesis proceeds even when eIF2 $\alpha$  is phosphorylated, we decided to look for the presence of other initiation factors known to attenuate or substitute for the absence of a func-

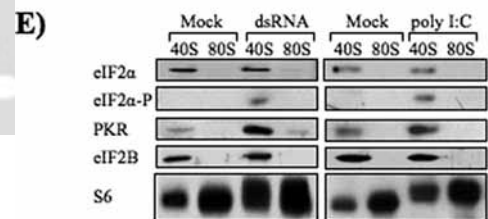
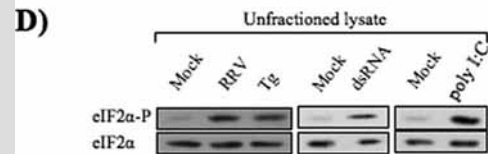
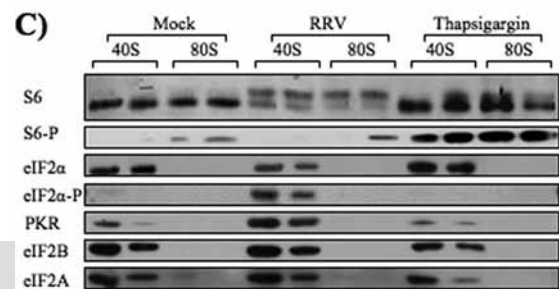
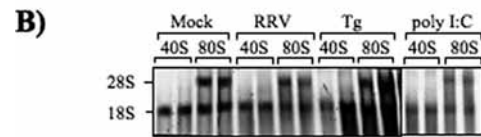
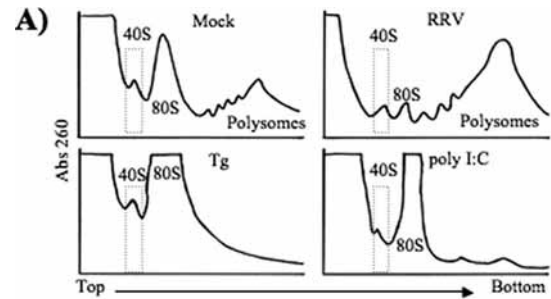


FIG. 5. Analysis of initiation translation complexes formed during rotavirus infection. MA104 cells were infected with rotavirus RRV at an MOI of 3, treated with thapsigargin (400 nM), or transfected for 1 h with 5  $\mu$ g/ml poly(I:C) or purified rotavirus dsRNA. Six hours after the indicated treatment, cells were lysed by homogenization in the presence of 100  $\mu$ g/ml cycloheximide and were loaded into discontinuous sucrose gradients (10 to 50%). (A) The sucrose gradients were fractionated using an absorbance monitor, and the OD $_{260}$  profiles were obtained. (B) The presence of the indicated ribosomal complexes was confirmed by visualizing the 28S and 18S ribosomal RNAs by the ethidium bromide staining of agarose gels. (C and E) The indicated fractions or the total, nonfractionated lysates (D) were tested for the presence of several translation initiation factors by immunoblotting using antibodies against phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P), total eIF2 $\alpha$ , PKR, eIF2Be, eIF2A, S6, or phospho-S6 (S6-P) as indicated.

tional eIF2 $\alpha$  in the 40S and 80S ribosomal complexes. To do this, the ribosomal complexes from mock-infected, RRV-infected, or thapsigargin-treated cells were purified by sucrose density gradients. These gradients were fractionated, and their OD $_{260}$  profiles were obtained (Fig. 5A). Interestingly, the ri-

bosomal profiles were distinct for each condition; the peaks containing the 40S and 80S ribosomal complexes were more pronounced in mock-infected cells than in RRV-infected cells, whereas the polysomal profiles were more prominent in infected cells, suggesting that the initiation and, in general, the efficiency of the protein synthesis is increased in rotavirus-infected cells. In contrast, in cells treated with thapsigargin the polysomal profiles were not detectable, while the 80S fraction was very prominent (Fig. 5A), as previously reported (16). The presence of the small and large ribosomal subunits in the fractions indicated as 40S and 80S was confirmed by the presence of the 18S and 28S rRNAs, respectively (Fig. 5B). The protein contents present in the fractions containing the 40S and 80S ribosomal subunits from cells under different conditions were analyzed for the presence of several eIFs by Western blotting. When an antibody to the small ribosomal protein 6 (S6) was used, we found that this protein was present in all fractions (Fig. 5C). Interestingly, the pattern of S6 was different in cells infected with rotavirus (appearing as a double band) compared to that of mock-infected cells or cells treated with thapsigargin. It has been shown that in stress conditions S6 can be modified by phosphorylation, which promotes the selective translation of some mRNAs (15). When an antibody against the phosphorylated form of S6 was used, we found that this protein appeared phosphorylated in thapsigargin-treated cells (Fig. 5C), while in the cells infected with rotavirus the phosphorylation of S6 was scarce and did not correspond to the double band observed when probed with the anti-S6 antibody. These observations suggest that during rotavirus infection, there could be another modification of the S6 protein that is different from phosphorylation (Fig. 5C). When the presence of eIF2 $\alpha$  was assessed, we found that it was present in the 40S fractions, but not in the 80S fractions, of all three conditions; however, we found that the phosphorylated factor was present only in the 40S fractions of rotavirus-infected cells and not in the corresponding fractions of thapsigargin-treated cells (Fig. 5C), even though when total cell lysates from each condition were probed with antibodies against the phosphorylated eIF2 $\alpha$ , this factor was clearly phosphorylated in the cells treated with thapsigargin (Fig. 5D). Similarly, when the presence of PKR was analyzed, we found that this protein appeared in the 40S fractions of RRV-infected cells, and in smaller amounts in the corresponding fractions of the mock-infected or thapsigargin-treated cells. We then looked for the presence of initiation factors in the 40S fractions that could replace the function of eIF2 $\alpha$  when this factor is phosphorylated. Initiation factor eIF2A has been shown to have the same activity as that of eIF2 $\alpha$ , and it is functional during Sindbis and Semliki Forest viral infections (40). Factor eIF2B $\epsilon$  has been found to be overexpressed in vesicular stomatitis virus (VSV)-infected MEFs and to reduce the effect of eIF2 $\alpha$  phosphorylation by increasing the rate of nucleotide exchange on eIF2 (2). By Western blot analysis, we found that both factors were present in the 40S fractions of all three conditions tested (Fig. 5C).

**The changes in protein content of the 40S ribosomal subunits during rotavirus infection are caused primarily by dsRNA.** To establish if the trigger that causes the association of phosphorylated eIF2 $\alpha$  and PKR to the 40S fractions is particular to the infection with rotavirus or if it is part of a general

antiviral response of the cell to the presence of dsRNA, MA104 cells were transfected with rotavirus-purified dsRNA or with poly(I:C), and 8 h posttransfection the cells were lysed and the ribosomal complexes were purified, as previously described. The polysomal profile obtained with these treatments was very similar to that obtained from thapsigargin-treated cells [shown in Fig. 5A for poly(I:C)], with an accumulation of 80S complexes and a near loss of the polysomal fractions. However, in contrast to our findings for thapsigargin-treated cells, the dsRNA or poly(I:C) treatments induced the accumulation of phosphorylated eIF2 $\alpha$  and PKR in the 40S complexes, and the modification of S6, similarly to the changes observed during rotavirus infection (Fig. 5E). Taken together, these results indicate that the changes of protein content observed in the 40S fractions are not specifically induced by the viral infection, and more likely they form part of the antiviral cellular response that is activated by dsRNA.

## DISCUSSION

Changes in physiological conditions, such as DNA damage, the accumulation of unfolded proteins, and viral infections, are examples of stress, which can result in eIF2 $\alpha$  phosphorylation, the main checkpoint of translation initiation. The phosphorylation of this factor results in the shut off of almost all protein synthesis. In the case of viral infections, this inhibition of protein synthesis prevents viral spread. To overcome the inhibitory effects of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, a wide range of viruses encode gene products that either prevent the activation of the eIF2 $\alpha$  kinases, like adenovirus and vaccinia virus (7, 34, 35), or increase the dephosphorylation rate of eIF2 $\alpha$ , like herpes simplex 1 and coronavirus infectious bronchitis virus (13, 42). However, in some cases, viral protein synthesis can proceed under conditions of elevated eIF2 $\alpha$  phosphorylation as has been observed for cricket paralysis virus, hepatitis C virus, and mouse hepatitis coronavirus (8, 30, 32, 33). Rotaviruses belong to this last group, since the synthesis of viral proteins proceeds robustly in the presence of a phosphorylated eIF2 $\alpha$  (18), and the level of protein translation is not modified when the GADD34/PPI complex is inhibited (Fig. 4).

In this work, we found the same level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in PERK<sup>+/+</sup> and PERK<sup>-/-</sup> MEFs infected with rotavirus, indicating that this kinase is not responsible for the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during the viral replication cycle (Fig. 1A). On the other hand, eIF2 $\alpha$  was strongly phosphorylated in rotavirus-infected PKR<sup>+/+</sup> MEFs, whereas its phosphorylation was almost undetectable in PKR<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 1B) or in MA104 cells in which PKR was silenced by RNAi, indicating that PKR is the main kinase involved in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  during rotavirus infection. Many events during the infection could induce the activation of eIF2 $\alpha$  kinases; these events include virus binding and the penetration of the cell membrane, viral protein synthesis, and the transcription and replication of the viral genome. The fact that UV-psoralen-inactivated particles did not induce the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , together with the observation that transfected infectious virus promotes the phosphorylation of this factor, indicate that the virus entry process is not the event that triggers the activation of PKR during rotavirus infection. On the other hand, the transfection of MA104 cells with purified viral

dsRNA, or with synthetic poly(I:C), was able to induce the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  for up to 8 h (Fig. 2B and C). Moreover, besides the shut off of cell protein synthesis observed in cells infected with rotavirus or transfected with dsRNA, several of the proteins that were present in the 40S ribosomal fractions of rotavirus-infected cells, but not in mock-infected or thapsigargin-treated cells, also were present in dsRNA-treated cells, like the phosphorylated form of eIF2 $\alpha$  and PKR. These results suggest that dsRNA is the trigger of PKR activation during rotavirus infection.

dsRNA originally was characterized as a key mediator of interferon (IFN) induction in response to virus infection; historically, dsRNA has been considered a by-product of viral replication in mammalian cells, which is exploited by the cell to restrict virus growth and limit virus spread. Once the cell sensors detect dsRNA, a cascade of events is activated promoting the shut off of cell protein synthesis, the transcriptional induction of interferon (IFN) and other cytokines, and finally cell death. This response to viral dsRNA is a key component of the IFN system, and it represents the first line of defense of the cell to limit viral replication. Traditionally it has been assumed that the rotaviral dsRNA is hidden from the IFN system by ensuring that genome replication takes place within replicative intermediate particles, such that the single-stranded RNA (ssRNA) is replicated as it enters these particles (23). To our surprise, staining with a MAb that recognizes dsRNA stretches longer than 40 bases detected the presence of dsRNA scattered in the cytoplasm (outside viroplasm) of rotavirus-infected cells (Fig. 2D). The dsRNA detected by the antibody is most likely the RNA sensed by PKR, with its consequent activation. The nature of the viral dsRNA present in the cytoplasm of infected cells is not clear; the possibility that it could be highly structured viral mRNA containing stretches of dsRNA of more than 40 bp was discarded, since bona fide mRNA that was stained with the anti-dsRNA MAb was degraded by RNase A, but the RNA detected in infected cells was degraded only by RNase III, which is specific for dsRNA (Fig. 3), suggesting that most likely the RNA in the cytoplasm of infected cells is viral dsRNA. This last possibility also is supported by the observation that when RRV VP1 and VP2 proteins are silenced by RNAi, there is a limited synthesis of viral mRNAs (more likely due to the transcriptional activity of the entering particle), and the production of dsRNA is almost completely abolished (1). We found that the signal detected by MAb J2 (i.e., the presence of dsRNA in the cytoplasm of the cells) was greatly reduced (data not shown). It remains to be determined how the viral dsRNA reaches the cytoplasm, outside viroplasm, which are the sites of rotaviral genome replication. In conclusion, our results show that during rotavirus infection, viral dsRNA can be detected in the cytoplasm, inducing the activation of PKR, eIF2 $\alpha$  phosphorylation, and the modification of the cellular translation machinery. Rotavirus seems to be immune to this response of the cell, since its mRNAs can be efficiently translated under these conditions, although the precise translation mechanism used by rotavirus remains to be uncovered. The viral response to the other branch elicited by dsRNA, the IFN system, seems to be elegantly controlled (in a cell type- and strain-specific manner) by NSP1 (3, 37, 38). Finally, besides PKR, dsRNA induces the activation of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L sys-

tem, which catalyzes the degradation of most RNAs, contributing to a general shut off of protein synthesis (12). Whether or not this system is activated during rotavirus infection currently is under investigation; however, given the efficient translation of the viral mRNAs in infected cells, we believe that this virus has evolved a mechanism to overcome this system as well.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rafaela Espinosa and Pedro Romero for their technical assistance with cell culture and rotavirus purification. We thank Tomas Lopez for his help with DLP transfection and helpful discussions, Nahum Sonenberg and Mauro Costa-Mattioli for their help to get the S57A MEFs, and Antonis Koromilas and David Ron for kindly providing PKR<sup>-/-</sup> and PERK<sup>-/-</sup> MEFs, respectively.

This work was supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, IN212288 from DGAPA-UNAM, and 60025 from CONACyT. M.R. is the recipient of a scholarship from CONACyT.

#### REFERENCES

1. Ayala-Breton, C., M. Arias, R. Espinosa, P. Romero, C. F. Arias, and S. Lopez. 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J. Virol.* **83**:8819–8831.
2. Balachandran, S., and G. N. Barber. 2004. Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* **5**:51–65.
3. Barro, M., and J. T. Patton. 2007. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J. Virol.* **81**:4473–4481.
4. Boyce, M., K. F. Bryant, C. Jousse, K. Long, H. P. Harding, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ma, D. M. Coen, D. Ron, and J. Yuan. 2005. A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**:935–939.
5. Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**:545–556.
6. Estes, M. K., and A. Z. Kapikian. 2007. Rotaviruses, p. 1917–1974. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2, Philadelphia, PA.
7. Gale, M., Jr., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5208–5218.
8. Garagorta, U., and F. V. Chisari. 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* **6**:513–522.
9. González, R. A., R. Espinosa, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* **145**:1963–1973.
10. Guthenberg, C., and B. Mannervik. 1979. Purification of glutathione S-transferases from rat lung by affinity chromatography. Evidence for an enzyme form absent in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**:1304–1310.
11. Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron. 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**:897–904.
12. Hassel, B. A., A. Zhou, C. Sotomayor, A. Maran, and R. H. Silverman. 1993. A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J.* **12**:3297–3304.
13. He, B., M. Gross, and B. Roizman. 1997. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 $\alpha$  to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:843–848.
14. Herring, A. J., N. F. Inglis, C. K. Ojeh, D. R. Snodgrass, and J. D. Menzies. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* **16**:473–477.
15. Jefferies, H. B., C. Reinhard, S. C. Kozma, and G. Thomas. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:4441–4445.
16. Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I. J. Miller, J. Stahl, and P. Anderson. 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* **13**:195–210.
17. Montero, H., C. F. Arias, and S. Lopez. 2006. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* **80**:9031–9038.
18. Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, and S. Lopez. 2008. Rotavirus infection



- induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **82**:1496–1504.
19. **Nicholson, A. W.** 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:371–390.
  20. **Novoa, I., H. Zeng, H. P. Harding, and D. Ron.** 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J. Cell Biol.* **153**:1011–1022.
  21. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200.
  22. **Parashar, U. D., J. S. Bresee, and R. I. Glass.** 2003. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull. World Health Organ.* **81**:236.
  23. **Patton, J. T., and C. O. Gallegos.** 1990. Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J. Gen. Virol.* **71**:1087–1094.
  24. **Patton, J. T., K. Kearny, and Z. F. Taraporewala.** 2003. Rotavirus genome replication: role of the RNA-binding proteins, p. 165–184. *In* U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*, 9th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
  25. **Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol, and C. U. Hellen.** 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:7029–7036.
  26. **Pestova, T. V., J. R. Lorsch, and C. U. T. Hellen.** 2007. The mechanism of translation initiation in eukaryotes, p. 87–128. *In* M. B. Mathews, N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey (ed.), *Translational control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  27. **Piron, M., P. Vende, J. Cohen, and D. Poncet.** 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**:5811–5821.
  28. **Poncet, D.** 2003. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell, p. 185–205. *In* U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*, 9th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
  29. **Proud, C. G.** 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**:3–12.
  30. **Raaben, M., M. J. Groot Koerkamp, P. J. Rottier, and C. A. de Haan.** 2007. Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell Microbiol.* **9**:2218–2229.
  31. **Raines, R. T.** 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**:1045–1066.
  32. **Rivas-Estilla, A. M., Y. Svitkin, M. Lopez Lastra, M. Hatzoglou, A. Sherker, and A. E. Koromilas.** 2002. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J. Virol.* **76**:10637–10653.
  33. **Robert, F., L. D. Kapp, S. N. Khan, M. G. Acker, S. Kolitz, S. Kazemi, R. J. Kaufman, W. C. Merrick, A. E. Koromilas, J. R. Lorsch, and J. Pelletier.** 2006. Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP. Met-tRNA (i) (Met) ternary complex availability. *Mol. Biol. Cell* **17**:4632–4644.
  34. **Romano, P. R., F. Zhang, S. L. Tan, M. T. Garcia-Barrio, M. G. Katze, T. E. Dever, and A. G. Hinnebusch.** 1998. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**:7304–7316.
  35. **Schneider, R. J., B. Safer, S. M. Munemitsu, C. E. Samuel, and T. Shenk.** 1985. Adenovirus VAI RNA prevents phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit subsequent to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:4321–4325.
  36. **Schönborn, J., J. Oberstrass, E. Breyel, J. Tittgen, J. Schumacher, and N. Lukacs.** 1991. Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acids Res.* **19**:2993–3000.
  37. **Sen, A., N. Feng, K. Ettayebi, M. E. Hardy, and H. B. Greenberg.** 2009. IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation. *J. Virol.* **83**:10322–10335.
  38. **Sherry, B.** 2009. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**:559–567.
  39. **Silvestri, L. S., Z. F. Taraporewala, and J. T. Patton.** 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.* **78**:7763–7774.
  40. **Ventoso, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco, and M. Esteban.** 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 $\alpha$  phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* **20**:87–100.
  41. **Wang, S., J. F. Raven, D. Baltzis, S. Kazemi, D. V. Brunet, M. Hatzoglou, M. L. Tremblay, and A. E. Koromilas.** 2006. The catalytic activity of the eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$  kinase PKR is required to negatively regulate Stat1 and Stat3 via activation of the T-cell protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **281**:9439–9449.
  42. **Wang, X., Y. Liao, P. L. Yap, K. J. Png, J. P. Tam, and D. X. Liu.** 2009. Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining de novo protein synthesis in virus-infected cells. *J. Virol.* **83**:12462–12472.
  43. **Weber, F., V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan.** 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J. Virol.* **80**:5059–5064.
  44. **Yang, D., F. Buchholz, Z. Huang, A. Goga, C. Y. Chen, F. M. Brodsky, and J. M. Bishop.** 2002. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:9942–9947.