



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EL RNA DE ROTAVIRUS SECUESTRA A VARIAS PROTEÍNAS DE UNIÓN AL
RNA CELULARES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. ALFONSO OCEGUERA CABRERA

TUTOR PRINCIPAL

Dra SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

[CIVESTAV, IPN](#)

Dr. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA CONDE

[Centro de Dinámica Celular, UAEM](#)

Cuernavaca, Mor. Febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Susana López Charretón y contó con el apoyo del donativo IG200317 de la DGAPA/UNAM y 153639 del CONACyT. A. Ocegüera recibió una beca del CONACyT para realizar sus estudios de Doctorado.

El Comité Tutorial estuvo integrado por:

Dra. Susana López Charretón

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

(CINVESTAV-IPN)

Dr. Ramón González García Conde

(Centro de Dinámica Celular-UAEM)

El jurado designado para el Examen de Grado fue conformado por:

Dr. José Luis Puente García

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dr. Juan Ernesto Ludert León

(CINVESTAV-IPN)

Dr. Ignacio López González

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dr. Delia Vanessa López Guerrero

(Facultad de Nutrición-UAEM)

El autor de esta tesis agradece la asesoría y el excelente apoyo técnico proporcionada por la QBP. Rafaela Espinosa y por el M. en C. Marco Antonio Espinoza durante el desarrollo del presente trabajo.

Índice

Índice de abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Abstract	4
Introducción	5
Estructura	5
Ciclo de replicación	6
Gránulos de RNA y virus.....	8
Gránulos de estrés	8
Cuerpos de procesamiento	10
Gránulos de RNA y rotavirus	11
Proteínas de unión a sitios ricos en AU.....	12
Hipótesis.....	15
Objetivos	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.	15
Metodología	16
Células y virus.....	16
Infección.....	16
Western blot (WB)	16
Lista de anticuerpos primarios y secundarios.....	17
Inmunoprecipitación de complejos RNA-proteína mediante NSP3.....	17
Purificación de la proteína MS2-MBP	18
Purificación de complejos Proteína-RNA viral mediante MS2-MBP.	19
Transfección de siRNA.....	20
Inmunofluorescencias	20
Análisis de imágenes	21
Ensayos de Inmunoprecipitación	21
Semi-purificación de partículas virales	22
Resultados	23

Aislamiento de complejos RNA viral- proteína con MS2-MBP.....	23
Estandarización de los ensayos de Pull-Down del mRNA viral y proteínas.....	25
Purificación de los complejos proteínas-mRNA virales.....	27
Relocalización de HuR por infección de rotavirus RRV	30
Cuerpos de procesamiento durante la infección con rotavirus RRV	30
Disgregación de PB durante la infección con rotavirus.....	31
La concentración de las proteínas Xrn1 y Dcp1 permanece constante durante la infección de rotavirus	32
El número de PBs depende de la concentración del RNA viral en la célula.....	33
Relocalización de las proteínas marcadoras de GW-Bodies.	35
La relocalización de las proteínas marcadoras de los GW-bodies también se debe a la concentración del RNA viral en las células infectadas	37
La concentración intracelular de Ago2 aumenta durante la infección por Rotavirus	38
Las RBPs celulares interaccionan con el mRNA viral.	39
Las proteínas de los GW-bodies y PB tienen un papel durante la infección de rotavirus	41
Discusión	45
Interacciones Proteínas-RNA viral.....	45
PBs, degradación de RNA y rotavirus	47
GW-Bodies – maquinaria de silenciamiento y rotavirus.....	49
Conclusiones	53
Perspectivas	54
Referencias.....	55
ANEXO 1	58

Índice de figuras

Figura 1. Características estructurales de RV.....	6
Figura 2. Esquema de la estrategia utilizada para la purificación de RBPs asociados a RNA viral....	24
Figura 3. Obtención del RNAs MS2 y controles de detección de proteínas virales unidas a las construcciones NSP4M3-3' y 5'.....	27
Figura 4. Las proteínas TIA1 y HuR interaccionan con el RNA de RRV.....	29
Figura 5. Relocalización de HuR en células infectadas.....	30
Figura 6. Desagregación de PBs teñidos con anticuerpos contra Dcp1 y Xrn1 en células MA104 ...	32
Figura 7. Cuantificación de la concentración celular de Dcp1 y Xrn1 total durante la infección de rotavirus.....	33
Figura 8. El efecto del virus sobre Dcp1 y Xrn1 se ve alterado por el silenciamiento de VP1, VP3 y NSP3.....	35
Figura 9. La infección con rotavirus RRV lleva a la relocalización de las proteínas GW182 y Ago2..	36
Figura 10. La relocalización de las proteínas GW182 y Ago2 se debe a la concentración del mRNA viral.....	38
Figura 11. La concentración de la proteína Ago2 aumenta durante la infección con rotavirus RRV	39
Figura 12. El RNA viral se une a Xrn1, Dcp1, Ago2 y HuR en células infectadas con rotavirus.....	40
Figura 13. Efecto de los RBPs sobre el ciclo de infección de rotavirus.....	44

Índice de abreviaturas

Ago2	Proteína Argonauta 2
AREs	Elementos ricos en Adenina y Uracilo
Dcp1	Enzima decapping 1
DLP	Partícula de doble capa
DNA	Acido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
Gw182	Proteína Gawky (TNRC6A)
HuR	Human antigen R
MBP	Proteína de unión a maltosa
MEM	Medio mínimo esencial Eagle
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
NSP	Proteína no estructural
PABP	Proteína de unión a poli A
PBs	Cuerpos de procesamiento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSF	Función de dispersión de la luz
RBP s	Proteínas de unión a RNA
RE	Retículo endoplásmico
RG	Gránulos de RNA
RNA	Acido ribonucleico
RRV	Cepa de RV de simio Rhesus

RV	Rotavirus
SFB	Suero fetal bovino
SGs	Gránulos de estrés
siRNA	RNA de interferencia
SLP	Partícula de una capa
TIA	Antígeno intracelular de células T
TIAR	Receptor TIA
TLP	Partícula de triple capa
UTR 3'	Región no traducida 3' terminal
UTR 5'	Región no traducida 5' terminal
VP	Proteína viral
WB	Western Blot
Xrn1	exoribonucleasa 1

Resumen

Los rotavirus representan una de las causas más importantes de gastroenteritis aguda en una gran variedad de mamíferos en sus primeros años de vida, incluyendo al humano. Como todos los miembros de la familia *Reoviridae*, el genoma de estos virus está formado por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). En nuestro laboratorio estamos interesados en caracterizar el papel que tienen las proteínas de unión al RNA (RBPs) en el ciclo replicativo del rotavirus. Durante las infecciones virales, es común encontrar la acumulación de una gran cantidad de RNA viral en el citoplasma de la célula hospedera, el cual es utilizado por el virus para su replicación y para la traducción de sus proteínas, lo que garantiza una infección exitosa. Sin embargo, existe una cantidad cada vez mayor de ejemplos de interacciones entre el RNA viral y distintas proteínas celulares. En muchos casos estas interacciones regulan las funciones del RNA (traducción, replicación, degradación). Aunque, hay ejemplos en los que la acumulación de grandes cantidades de RNA puede funcionar como una “esponja”, que interactúa y secuestra RBPs celulares (Charley and Wilusz 2014).

Se ha demostrado que los gránulos de RNA pueden regular el metabolismo, la expresión génica y el decaimiento del RNA celular, por lo que representan un blanco importante para el control de la infección viral. En este trabajo mostramos que durante la infección de rotavirus se dan cambios en la localización celular de algunas RBPs, y que son dependientes de la concentración del mRNA viral. Por un lado, se promueve la translocación núcleo-citoplasma de la proteína HuR, por otro se inhibe la agregación de RBPs en los cuerpos de procesamiento (PBs), y se relocalizan algunas proteínas de los GW-Bodies hacia los viroplasma. Finalmente, en este trabajo también mostramos que estas RBPs desempeñan papeles específicos durante la infección de rotavirus.

Abstract

Rotavirus represents an important cause of acute gastroenteritis in a wide variety of young animals, including humans; like all members of the Reoviridae family, the genome of this virus is formed by 11 segments of dsRNA. We are interested in characterizing the role that RNA-binding proteins (RBPs) have in the replication cycle of rotavirus. During viral infections it's common to see a large accumulation of viral RNAs in the cell's cytoplasm, which is used for viral replication and translation in order to get a productive infection. There is an increasing number of examples of viral RNA and intracellular protein interactions, in many cases these interactions have specific viral RNA regulatory functions (translation, replication, degradation), nevertheless, there are evidences that accumulation of big amounts of viral RNA can function as sponge, which interacts and hijack cellular proteins (Charley and Wilusz 2014).

It has been shown that RNA granules can regulate the metabolism, gene expression, and decay of cellular RNAs, and as such they represent an important manipulation point by viruses. In this work we show that during rotavirus infection there are changes in the distribution of some RNA binding proteins, and these changes are dependent of the viral mRNA concentration, in the case of HuR, this protein is relocalized from the nuclei to the cytoplasm, and PBs and GW-bodies proteins also change their distribution in the cell. Moreover, we have found that these proteins might have a role during rotavirus infection.

Introducción

Rotavirus (RV) es uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis durante los primeros años de vida en humanos y animales (Bagci *et al.* 2010). Estos virus pertenecen a la familia *Reoviridae* y se caracterizan por ser virus de cápside icosaédrica no envueltos y con un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) (Jayaram *et al.* 2004).

Estructura

La cápside del RV, como la de todos los virus es una estructura que protege al genoma y permite la entrada del virus a la célula hospedera en donde se llevará a cabo el ciclo de replicación viral. Los viriones (partículas infecciosas completas) del RV o TLPs (del inglés Triple-Layered Particles) constan de 3 capas concéntricas formadas por proteínas virales, sin embargo, existen otras 2 posibles formas de partículas rotavirales, las partículas bi-laminares o DLPs (del inglés Double-Layered Particles), y las partículas unilaminares o SLPs (del inglés Single-Layered Particles) (Jayaram *et al.* 2004). La capa externa del RV forma una estructura icosaédrica, consta de 780 moléculas de la proteína VP7 arregladas en trímeros y 60 espículas constituidas por trímeros de la proteína VP4 (Fig. 1 panel B). Esta capa externa envuelve a la capa intermedia que está constituida por 780 moléculas de VP6 arregladas en trímeros, y finalmente la capa más interna de la cápside está compuesta de 120 moléculas de VP2 arregladas en forma de 60 dímeros, (McClain *et al.* 2010). En el núcleo de la partícula viral se encuentran 12 copias de VP1 que es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y 12 copias de VP3 que tiene actividad de guanilil-metil-transferasa (Fig. 1 panel C y D). Alrededor de estas proteínas se encuentra el genoma de viral, compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), que codifican para 12 proteínas, de las cuales 6 son estructurales (VPs) y 6 son no estructurales (NSP1-6) (Estes and Cohen 1989; Jayaram *et al.* 2004) (Fig. 1 panel A).

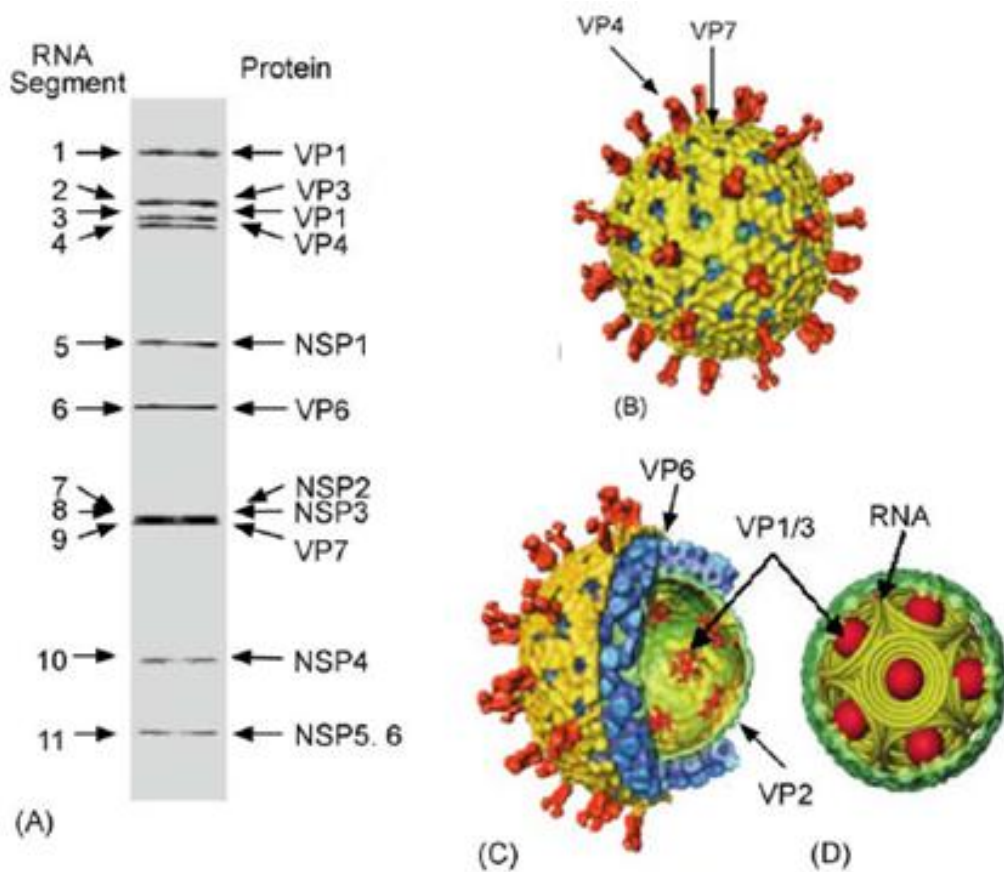


Figura 1. Características estructurales de RV

A) Gel de acrilamida en el que se muestra el genoma de RV, a excepción del segmento 11 que es bicistrónico, los otros segmentos virales codifican para una sola proteína. **B)** Imágenes obtenidas de criomicroscopía electrónica de una partícula tri-laminar (TLP) de RV, en rojo están representadas las espículas formadas por VP4 y en amarillo están representadas los trímeros de VP7. **C)** Corte de una TLP en donde se muestran las capas internas formadas por las proteínas VP6 (azul) y VP2 (verde) así como las proteínas VP1 y VP3 (rojo). **D)** Corte transversal de la capa más interna de RV en el que se representa la organización del genoma, cada uno de los segmentos está representado como un espiral cónico rodeando la maquinaria de transcripción viral que se localiza en los ejes de simetría 5 de la partícula. Tomado de (Jayaram *et al.* 2004).

Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de Rotavirus comienza con la unión del virus a su célula hospedera, este es un proceso que involucra una serie de eventos, primero la partícula viral reconoce a glicanos celulares presentes en su membrana, para después interactuar con varios co-receptores específicos dentro de los cuales se encuentran algunas integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y $X\beta 2$) y la proteína Hsc70, por otro lado, recientemente se ha observado que las proteínas JAM-A y ZO-1 son importantes para la entrada de algunas cepas de RV,

sin embargo, aun no se conoce la secuencia exacta en el que estas interacciones se llevan a cabo (Arias *et al.* 2015). La internalización del virus a la célula es un proceso que depende de interacciones secuenciales con varios ligandos, así como de una serie de cambios conformacionales en las proteínas de la cápside para finalmente entrar a la célula mediante un proceso endocítico (Arias *et al.* 2002). Durante el tráfico de la vesícula endocítica, el RV pierde la capa externa de la cápside (a este proceso se le conoce como desnudamiento) en un proceso dependiente de los niveles de Ca^{2+} intracelulares para posteriormente salir de dicha vesícula hacia el citoplasma celular. Las DLPs resultantes son transcripcionalmente activas y llevan a cabo la primera ronda de transcripción viral (transcripción primaria) en la que se sintetizan los mRNAs virales que funcionan como mensajeros para dirigir la síntesis de las proteínas virales. La traducción de las proteínas virales se da en un proceso en el que el RV toma el control de la maquinaria de traducción celular inhibiendo la síntesis de proteínas celulares y favoreciendo la síntesis de las proteínas virales. Cuando se acumula una masa crítica de proteínas virales, éstas se agregan dando lugar a inclusiones citoplásmicas llamadas viroplasmos, en donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral y el ensamble de más DLPs, las cuales inician una nueva ronda de transcripción (transcripción secundaria) (Ayala-Breton *et al.* 2009) (Knipe 2006). Las DLPs a su vez geman hacia el lumen del retículo endoplásmico (ER) en donde se lleva a cabo su maduración (Maruri-Avidal *et al.* 2008), es decir, adquieren la cápside externa. Se ha propuesto que en las células CaCo-2 (de cáncer de colon), la interacción de VP4 con balsas lipídicas durante etapas tardías de la infección provoca una remodelación del citoesqueleto, lo que llevaría a la desestabilización de la membrana celular y finalmente a la liberación de la progenie viral mediante la lisis de la célula hospedera (Knipe 2006).

Como en todas las infecciones virales, los rotavirus han evolucionado para tomar el control de ciertos procesos celulares como lo son la respuesta inmune, innata la maquinaria de traducción, la degradación de proteínas, la respuesta al estrés y la regulación celular de los mRNAs entre otros, lo que garantiza el éxito de su ciclo de

infección. Dentro de estos puntos de control se encuentran los denominados “gránulos de RNA”.

Gránulos de RNA y virus

El control de la traducción y el recambio de los mRNAs celulares juegan un papel fundamental en la expresión de genes. Las células eucarióticas han desarrollado diferentes mecanismos para controlar estos procesos y así responder de manera eficiente a los diferentes tipos de estrés que se pueden encontrar en el medio ambiente, tales como radiación UV, hipoxia, choque térmico, estrés de ER, infecciones virales y otras agresiones. Entre estos mecanismos de defensa se encuentran los agregados de proteínas y RNAs, celulares llamados de manera genérica, gránulos de RNA (RGs). Al estar constituidos por RNA y proteínas de unión a RNA, los RGs forman parte del aparato de regulación del RNA en la célula. Los RGs no están delimitados por membrana y se clasifican dependiendo su localización subcelular (núcleo, citoplasma, axón, etc.); en el núcleo se encuentra el nucléolo, los speckles, los para-speckles, los cuerpos PML y los cuerpos de Cajal, mientras que en el citoplasma se encuentran los gránulos polares y germinales, los gránulos de estrés (por sus siglas en inglés, SGs) y los cuerpos de procesamiento (por sus siglas en inglés PBs).

Como parásitos obligados, los virus han desarrollado distintas formas de aprovechar las funciones de sus células hospederas asegurándose de esta manera de maximizar la producción de su progenie y por supuesto RGs no son la excepción. A continuación describimos las características principales de los SGs y de los PBs.

Gránulos de estrés

Como su nombre lo indica, los SGs son agregados de RNA-proteína que se forman cuando la célula se encuentra bajo algún tipo de estrés. En general, en condiciones de estrés se activa la fosforilación del factor de traducción eIF2 α , dando como resultado la inhibición de la traducción de la mayoría de los mRNAs celulares que no son necesarios para contender con dicho estrés. La fosforilación de eIF2 α , lleva al bloqueo de la

formación del complejo ternario de la traducción compuesto por eIF2a GTP y el tRNA con metionina provocando la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y virales, siendo esta una de las principales vías para contrarrestar las infecciones virales (Montero and Trujillo-Alonso 2011). Cuando eIF2 α se fosforila, varias RBPs se agregan a los complejos de iniciación de la traducción y junto con los mRNAs unidos a algunas de las proteínas del complejo de inicio de la traducción se agregan, dando lugar a la formación de los SGs (Harvey *et al.* 2017) (Sheinberger and Shav-Tal 2017). Hasta ahora se conocen 4 cinasas capaces de fosforilar a eIF2 α ; HRI (heme-regulated eIF2a kinase) la cual se activa en estrés oxidativo y privación del grupo hemo; PKR (protein kinase RNA-dependent) la cual es una cinasa dependiente de dsRNA activada por infecciones virales; PERK/PEK (PKR-like ER kinase) que es activada durante hipoxia y en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el ER; y GCN2 (general control non-depressive-2) la cual se activa por ayuno de aminoácidos y/o irradiación UV (Harvey *et al.* 2017); (Sheinberger and Shav-Tal 2017). No obstante, se sabe que en algunos casos se puede dar la formación de SGs de manera independiente a la fosforilación de eIF2 α como con el tratamiento con hippuristanol o proteamina A los cuales inhiben la actividad de helicasa de eIF4A; con inhibidores metabólicos que eliminan al adenosin trifosfato como oligomicina, FCCP o 2-deoxi-D-glucosa; el tratamiento con peróxido de hidrógeno (inductor de especies reactivas de oxígeno); así como también con la sobreexpresión de los marcadores de SGs TIA1/TIAR o G3BP-1 (Mokas *et al.* 2009); (Mazroui *et al.* 2006).

Se ha propuesto que la formación de los SGs es un mecanismo multifactorial en el que tienen lugar procesos como la agregación y modificación de proteínas así como el transporte en la red de microtúbulos (Tourriere *et al.* 2003; Gilks *et al.* 2004; Ohn *et al.* 2008). La composición de los SGs puede variar según el tipo de estrés que indujo su formación, sin embargo se puede decir que los SGs están formados de complejos de inicio de la traducción arrestados y por lo tanto contienen una alta concentración de factores del inicio de la traducción tales como eIF4E, eIF4G eIF4A eIF3, eIF2, PABP. De igual forma en estas estructuras se encuentran proteínas con afinidad a RNA tales como HuR, FMRP, FXR1, TIAR, Caprin1 (Harvey *et al.* 2017). Si bien muchas de las proteínas que forman a los

SGs no son exclusivas de estas estructuras, existen proteínas que funcionan como marcadores de SGs tales como G3BP, TIA1 y TDRD3. Los SGs son estructuras altamente dinámicas y mantienen un flujo de proteínas y mRNAs que pueden transportarse a los polisomas y/o a los PBs (Kedersha *et al.* 2005; Wilczynska *et al.* 2005).

Como se ha mencionado anteriormente los SGs son estructuras encargadas de modular la expresión de proteínas en respuesta al estrés celular como en el caso de las infecciones virales. En la literatura existen muchos ejemplos de virus que pueden impedir la formación de estas estructuras, como el virus de la Influenza A y Reovirus (Legros *et al.* 2011; Khapersky *et al.* 2012; Valiente-Echeverria *et al.* 2014; Dougherty *et al.* 2015), algunos otros que pueden modular su aparición, un ejemplo de esto es el virus de la Hepatitis, el cual de una manera dependiente de la fosforilación de eIF2a puede inducir la formación o la disolución de los SGs, esta oscilación de prendido y apagado de los SGs, lo que permite o reprime la traducción de proteínas celulares y virales, esta oscilación puede durar días y le permite al virus mantener a su célula hospedera viva para mantener su infección de manera crónica (Qin *et al.* 2009; Qin *et al.* 2011; Ruggieri *et al.* 2012) y otros virus que secuestran algunas proteínas de SGs inhibiendo su formación y a veces las usan para su beneficio tal como Semliki Forest virus, Sinbis Virus y West Nile Virus (Emara and Brinton 2007; Panas *et al.* 2012).

Cuerpos de procesamiento

Los PBs son agregados de mRNAs asociados con la represión de la traducción y con la maquinaria de degradación de RNAs, que a diferencia de los SGs, se encuentran presentes en todo momento en la célula. Existen varios reportes que indican que durante distintos tipos de estrés su número y su tamaño pueden aumentar (Kedersha *et al.* 2005; Martinez *et al.* 2013). El mecanismo mediante el cual se forman los PBs no se ha dilucidado aún, pero se sabe que involucra una serie de pasos de condensación de proteínas de unión a RNA así como la organización del mRNA dentro de la estructura, también se sabe que el aumento en el tamaño de los PBs depende de microtúbulos (Aizer

et al. 2008) (Sweet *et al.* 2007). Aunque la composición exacta de las proteínas de los PBs no ha sido totalmente determinada, se conoce un “núcleo” de proteínas que forman parte de los PBs, dentro de las cuales se encuentran deadenilasas (CCR4/POP2/NOT), las enzimas que remueven el cap del extremo 5' del RNA (deccapping enzymes (Dcp1/Dcp2), exonucleasas (Xrn1), y proteínas de unión a RNA involucradas en la degradación de RNA por “nonsense-mediated decay” y el silenciamiento mediado por microRNAs (Ago2/GW182) (Franks and Lykke-Andersen 2008) (Decker and Parker 2012). El tipo de proteínas contenidas en estas estructuras sugiere que los PBs modulan la degradación de RNAs, aunque también se sabe que los PBs podrían funcionar como un almacén de mRNAs para su traducción posterior, jugando un papel muy importante en la regulación de la traducción (Decker and Parker 2012). Se ha encontrado que en los PBs se llevan a cabo dos vías de degradación de RNA; la degradación de los mRNAs mensajeros 5'-3' por la exonucleasa Xrn1 y el “nonsense-mediated mRNA decay” mediante microRNAs. Actualmente existen reportes de dos pozas diferentes de PBs; los PBs convencionales que tienen la función de degradación de mRNAs a través de Xrn1 y un segundo tipo llamado GW-bodies en los que se encuentran varias de las proteínas involucradas en el silenciamiento de mRNAs (Patel *et al.* 2016).

Existen reportes que demuestran que algunos virus, como los Enterovirus, Coxsackievirus y poliovirus son capaces de evitar la formación de estas estructuras e incluso en algunos casos de utilizar algunas de sus proteínas a favor de la infección viral, como son los casos de los Flavivirus y Hepatitis C (Dougherty *et al.* 2011; Perez-Vilaro *et al.* 2012; Chahar *et al.* 2013; Corcoran *et al.* 2015).

Gránulos de RNA y rotavirus

Durante la infección por rotavirus se ha observado que el factor eIF2 α se fosforila durante una infección temprana provocando una disminución en la concentración de proteínas celulares. Sin embargo, la traducción de las proteínas virales se mantiene aún en presencia de tapsigargina, un inductor de estrés celular que induce la fosforilación de

eIF2 α (Montero *et al.* 2008). Por otro lado, la proteína PKR es la responsable de la fosforilación de eIF2 α durante la infección con rotavirus RRV en células MA104 (Rojas *et al.* 2010). Lo que sugiere que la célula es capaz de detectar el RNA genómico de RV durante la infección, desencadenando la fosforilación de eIF2 α . Como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación de eIF2 α es esencial para la formación de SGs; Sin embargo, durante la infección de RV no se observa la formación de los SGs aún en presencia de taspargina, aunque todavía no se ha determinado el mecanismo mediante el rotavirus impide la formación de los SGs (Montero *et al.* 2008).

Recientemente se mostró que las cepas de rotavirus SA11, Wa y OSU inhiben la formación de los PBs mediante la degradación y/o relocalización de varias proteínas marcadoras de estas estructuras y que la proteína Pan2/3 se degrada por una vía dependiente de la proteína viral NSP1, mientras que las proteínas Dcp1 y Xrn1 se relocalizan al núcleo (Bhowmick *et al.* 2015). Sin embargo, en este estudio solamente caracterizaron proteínas de la vía degradativa de los PBs y no estudiaron las proteínas de los GW-bodies que participan en el silenciamiento mediado por los miRNAs.

Proteínas de unión a sitios ricos en AU

Como se ha mencionado, en las células eucariotas los niveles de expresión genética y la abundancia de proteínas están sujetas a regulación. El metabolismo del mRNA permite adaptarse rápidamente a cambios en las condiciones ambientales, los procesos de regulación post-transcripcional determinan el destino de los mRNAs y por consiguiente también los niveles de expresión de cada proteína. Cuando un transcrito es sintetizado en el núcleo, éste es reconocido por RBPs, lo que representa el primer punto de regulación, en donde se activan los procesos de splicing, la poliadenilación y el capping del transcrito, generando un mRNA maduro, que se exporta al citoplasma unido a otras RBPs. Una vez en el citoplasma su estabilidad, distribución y traducción del mRNA también son coadyuvadas por RBPs (Matoulkova *et al.* 2012).

Dentro de las RBPs, las proteínas AREs (de “*adenylate and uridylate-rich elements*”) funcionan como factores que reconocen secuencias ricas en adenina y uridina normalmente presentes en la región 3' UTR de los mRNAs celulares, y que se han denominado sitios AREs. Estos sitios se encuentran presentes en el 5-8% de los mRNAs de genes humanos encargados de diversas funciones como lo son crecimiento celular, diferenciación, transducción de señales, apoptosis, transporte de nutrientes y metabolismo. Esta lista de mRNAs representa principalmente genes involucrados en procesos transitorios y que por lo tanto requieren un control estricto de su expresión. Sin embargo, el destino de cada uno de los mRNAs que contienen secuencias AREs se encuentra determinado por las distintas interacciones que tienen con diferentes proteínas ARE-RBPs en un mismo tiempo, o por la competencia de distintas RBPs por un mismo sitio. Otro atributo adicional de las ARE-RBPs es que algunas de ellas tienen varios motivos de unión al RNA lo cual puede llevar a la interacción de estas proteínas con varios RNAs o con diversos sitios en un mismo RNA. Finalmente es importante mencionar que la mayoría de las ARE-RBPs se mueven entre el núcleo y el citoplasma y que su función depende de su localización en la célula.

HuR es una de las proteínas que se une a los sitios AREs de los RNAs, esta proteína es de localización predominantemente nuclear en donde es necesaria para la poliadenilación y el “*splicing*” de algunos mRNAs. Su función ha sido relacionada con su translocación al citoplasma, proceso mediante el cual se co-translocan algunos mensajeros celulares. Por otro lado, HuR también se une al RNAs blanco en el citoplasma de la célula, los sitios AREs localizados generalmente en la región 3' no traducida son señales reguladoras en *cis* frecuentemente presentes en RNAs de rápida degradación. Sin embargo, la unión de HuR a estos sitios por lo general provoca su estabilización y promueve la traducción de estos mensajeros. Dentro de los mRNAs blancos de HuR se encuentran RNAs involucrados en distintos procesos, como lo son la regulación del ciclo celular, la expresión de citosinas, de factores de crecimiento, supresores tumorales, protooncogenes, reguladores de apoptosis y algunas enzimas inflamatorias (Eberhardt *et al.* 2007). Moléculas como citosinas, factores de crecimiento, mediadores de la

inflamación, hormonas y agentes vasoactivos pueden promover la translocación núcleo citoplásmica de HuR, así como también varios tipos de estrés como la radiación UV, la hipoxia, privación de nutrientes y el estrés oxidativo. También es importante mencionar que HuR se encuentra relacionada con enfermedades humanas comunes como son la inflamación crónica, enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Eberhardt *et al.* 2007). Por su participación en el decaimiento del mRNA y su implicación durante el estrés celular HuR es una proteína blanco durante el ciclo de infección de algunos virus (Barnhart *et al.* 2013).

Dada la importancia de los gránulos de RNA y las proteínas de unión al mRNA en la regulación de la célula, en este trabajo nos propusimos caracterizar el papel de los PB y de RBPs durante la infección con rotavirus.

Hipótesis.

Los mRNAs del rotavirus se asocian a proteínas de los PBs y a los ARE-RBPs modificando su dinámica dentro de la célula.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la asociación de los mRNAs de rotavirus con algunas RBPs en células infectadas MA104 con RRV

Objetivos particulares.

1. Identificar qué proteínas celulares y virales interaccionan con los mRNA virales en el citosol.
2. Determinar cuál es el comportamiento de los cuerpos de procesamiento durante la infección por rotavirus.

Metodología

Células y virus

Se utilizó la línea celular MA104 (epitelial de riñón de mono verde), la cual fue cultivada en medio mínimo esencial Eagle (MEM) Advance al 5% SFB. La cepa de rotavirus utilizada en este trabajo fue la cepa de simio Rhesus (RRV).

Infección

Las células MA104 se cultivaron en medio MEM-Advanced con suero al 5% a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente se lavaron con MEM sin suero y se dejaron reposando por aproximadamente 30 min a 37°C. Las células se infectaron con el virus RRV (previamente tratado con tripsina a una concentración de 100 µg/ml a 37°C por 30 min). en MEM sin suero a la MOI indicada en cada caso. Para la adsorción, el virus se dejó incubando 1hr a 37°C con 5% de CO₂, posteriormente las células se lavaron con MEM/sin suero y se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO₂, finalmente las células fueron cosechadas según el tiempo de infección indicado en cada experimento.

Western blot (WB)

Las células fueron lisadas mediante dos ciclos de congelación-descongelación, posteriormente separamos a las proteínas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%, y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Estas membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS, incubándolas durante una hora a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en PBS con 1% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, se lavaron 4 veces con PBS tween 0.1% y se trataron con el anticuerpo secundario correspondiente (acoplados a peroxidasa o a los fluoróforos Alexa 488 ó 647, Tabla1) durante 1 h a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa se reveló mediante el Kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer LifeSciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal producida por los anticuerpos fluorescentes se registró con un Typhoon Trio

(Amersham), la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software ImageJ, para el procesamiento de los datos en todos los casos los datos se normalizaron con respecto al gen correspondiente de un lisado total a las 8 hpi.

Lista de anticuerpos primarios y secundarios

Nombre	Origen, tipo de anticuerpo	Dirigido contra	Fuente
αDcp1	Ratón, Monoclonal	Dcp1	Santa Cruz Biotechnology
αXrn1	Ratón, Monoclonal	Xrn1	Santa Cruz Biotechnology
αPP1	Ratón, Monoclonal	PP1	Santa Cruz Biotechnology
αGW182	Ratón, Monoclonal	GW182	Abcam
αAgo2	Ratón, Monoclonal	Ago2	Abcam
αHuR	Ratón, Monoclonal	HuR	Clonogene
αHsc70	Ratón, Monoclonal	Hsc70	StressGen
Alexa -568	Cabra, Alexa-568	IgG conejo, IgG ratón	Invitrogen
Alexa-488	Cabra, Alexa-488	IgG ratón/conejo	Invitrogen
Alexa-647	Cabra, Alexa-647	IgG ratón/conejo	MolecularProbes
α-Conejo-PO	Acoplado a peroxidasa	IgG conejo	KPL
αRatón-PO	Acoplado a peroxidasa	IgG ratón	Millipore Merck
αTLPs	Conejo, Policlonal	Cápside de rotavirus.	Producido en el laboratorio
αNSP2	Conejo, Policlonal	NSP2	Producido en el laboratorio

Inmunoprecipitación de complejos RNA-proteína mediante NSP3.

A menos que se indique lo contrario, los lavados, incubaciones y centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente. Células confluentes MA104 en cajas de 6 pozos (1.2×10^6 células) se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Las células se despegaron utilizando PBS-EDTA (0.2mM) a las 8 hpi y se centrifugaron por 5 min a 1000 RPM. La pastilla celular se lavó dos veces con 2 ml de PBS frío y se resuspendió en 880 μ l de buffer RIPA (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Tritón X100, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.05% SDS, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), más inhibidores de proteasas (Complete, mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet, Roche Molecular Biochemicals, IN). Las células se lisaron mediante tres rondas de sonicación de 20 segundos cada una, con dos minutos de incubación en hielo entre cada ronda. Finalmente, el lisado celular se centrifugó durante 10 min a 14000 RPM a 4° C. El sobrenadante resultante se utilizó para la inmunoprecipitación. Una suspensión al 50% de proteína A-sefarosa (40 μ l) se incubó con

5 μ l de anticuerpo anti-NSP3 y 80 μ l de buffer RIPA por 12 h a 4° C. Posteriormente, la proteína A-sefarosa se lavó 3 veces con RIPA y se incubó 10 min con 1 μ l de RNasin 40 U/ μ l (promega) en 80 μ l de RIPA. Para inmunoprecipitar, 120 μ l de lisado celular se incubaron con la proteína A-sefarosa durante 2 horas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, el sobrenadante del lisado no-unido a la proteína A-sefarosa proveniente de la inmunoprecipitación se recuperó y se utilizó para hacer WB o se lisó con 900 μ l de TRIzol para extraer el RNA total no-inmunoprecipitado. Las muestras unidas a la proteína A-sefarosa se lavaron 4 veces con 500 μ l Buffer RIPA de alta astringencia (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Tritón, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% dodecilsulfato de sodio (SDS), 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 1-4 M urea, 0.2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e inhibidores de proteasas Complete (Roche) durante 6 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la fracción unida a la sefarosa se utilizó ya sea para WB, o para extraer el RNA presente en el inmunoprecipitado mediante TRIzol.

Purificación de la proteína MS2-MBP

Para la purificación de la proteína MS2-MBP, se inocularon 3 ml de medio de cultivo LB con una sola colonia de bacterias DH5 α transformadas previamente con el plásmido que expresaba a la proteína MS2-MBP y se dejó creciendo toda la noche a 37°C con agitación continua. Se utilizaron 200 μ l de este cultivo para inocular 20 ml de LB (complementado con glucosa al 2%). Este cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0.5 y en ese punto se adicionó 1 μ l de IPTG 1M por cada ml de cultivo para inducir la expresión de la proteína. El cultivo se dejó crecer por otras 2-4 hrs en las mismas condiciones y posteriormente se cosecharon las células por centrifugación a 6000 rpm por 10 min y la pastilla resultante se congeló a -20°C hasta su uso.

La pastilla descongeló y fue resuspendido en 500 μ l con buffer AB1 (20 mM HEPES pH 7.9, 200 mM KCl, 1 mM EDTA) adicionado con PMSF (2 mM). Las células se lisaron mediante tres rondas de sonicación de 20 segundos en hielo con descansos de 20 segundos entre cada una, posteriormente la muestra se centrifugó por 30 min a 14000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante. A partir de este punto, los pasos subsecuentes

se realizaron a 4°C. Al sobrenadante se le adicionaron 200 µl de resina de amilosa y se agitó suavemente durante 2 hr, posteriormente la muestra se centrifugó a 2000 rpm por 3 min y se desechó el sobrenadante, la columna se lavó 3 veces con dos volúmenes de AB1 (15 min cada lavado) y dos veces con buffer AB2 (20 mM HEPES pH 7.9, 20 mM KCl y 1 mM de EDTA) y finalmente la muestra se eluyó con un volumen y un ¼ de la resina utilizada con buffer ABE (20 mM HEPES pH 7.9, 20 mM KCl y 1 mM de EDTA, 10 mM maltosa). La proteína obtenida se ~~fu~~ congeló a -20°C hasta su uso.

Purificación de complejos Proteína-RNA viral mediante MS2-MBP.

Para la purificación de los complejos, las células MA104 se infectaron con rotavirus RRV a una MOI de 5 a los tiempos mencionados para cada experimento. Posterior a la infección, las células se cosecharon con EDTA y se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min, y se desechó el sobrenadante. Aproximadamente 9.4×10^6 células se resuspendieron en 500 µl de buffer AB1 y se lisaron mediante 3 rondas de sonicación de 20 seg en hielo, la muestra se centrifugó a 14000 rpm por 30 min y se recuperó el sobrenadante. Para evitar uniones inespecíficas a la resina o a la proteína, el extracto celular fue preclareado durante 2 hr a 4°C con 50 µl de una mezcla 1:1 de resina y resina unida a MS2-MBP, la muestra se centrifugó por 3 min a 2000 rpm, y se recuperó el sobrenadante de la mezcla de resinas. 300 ng de RNA (construcciones MS2 o RNA control sin sitios MS2) fueron adicionados al sobrenadante y se incubaron durante 2 horas a 4°C con 500 µl de buffer AB1 complementado con PMSF e inhibidores de RNAsas por cada 100 µl de lisado celular, posteriormente se adicionó 10 µl de la proteína MS2-MBP previamente aislada y se dejó interactuando en agitación por 2 horas a 4°C. Pasado el tiempo de unión el complejo MS2MBP-RNA-Proteína se aisló adicionando 50 µl de resina de amilosa a la mezcla, se realizaron 3 lavados con buffer AB1 y 2 lavados con buffer AB2 por 15 min cada uno y finalmente se eluyó 5 veces con 10 µl de buffer ABE. La muestra obtenida se utilizó posteriormente para aislar RNA mediante TRIzol o para WB.

Transfección de siRNA

La transfección de los siRNAs en las células MA104 se realizó mediante el método de transfección reversa, 15 μ l de oligofectamina (Invitrogen) se diluyó en 75 μ l de MEM sin suero y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, esta mezcla se colocó por goteo en un pozo de una placa de 48, el cual contenía 15 μ l de una mezcla de siRNA a una concentración de 3 μ M en MEM libre de SFB y se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 200 μ l de una suspensión de células a una concentración de 1×10^6 células/ml y se incubaron en MEM sin suero por 12 horas a 37°C, una vez pasado este tiempo cambiamos el medio por MEM suplementado con suero e incubamos por 36 hrs a 37°C. Una vez concluido este tiempo de incubación trasladamos a las células según se describa en cada experimento.

Inmunofluorescencias

Las células MA104 se cultivaron en placas de 48 ó 96 pozos, sobre cubreobjetos de 10 mm o 5 mm, respectivamente, hasta confluencia, y se infectaron con rotavirus RRV durante el tiempo indicado en cada experimento, para después fijarlas con paraformaldehído al 2% por 20 min. A continuación, las células se lavaron 3 veces por 5 min con buffer de lavado (PBS-NH₄Cl 50 mM) y se permeabilizaron con TritónX100 al 0.5% en Buffer de bloqueo (PBS-NH₄Cl 50 mM, 1% BSA) por 15 min. El anticuerpo primario se preparó en buffer de bloqueo y las células se incubaron con la solución del anticuerpo primario por 1 hora, las células se lavaron 4 veces por 5 min a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo secundario en buffer de bloqueo por 1 hr. Como último paso, las células se lavaron 2 veces con buffer de lavado y se agregó DAPI a la muestra por 20 min para teñir el núcleo. Las células se lavaron 6 veces con buffer de lavado y finalmente se montaron los cubreobjetos con medio de montar AF1. Por último, las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia “Zeiss Axioskop2 mot plus” acoplado a una cámara digital cool SNAP HQ2. Para las imágenes confocales se utilizó el “Olympus confocal FluoView 1000 multifotonic” o “3I Marianas spinning disk confocal microscope”. Las imágenes se registraron con una cámara digital y analizadas con el software ImageJ.

Análisis de imágenes

Todos los análisis de imágenes realizados para las inmunofluorescencias se realizaron con el software ImageJ, para el conteo de los PBs primero se realizó una deconvolución de las imágenes con el plugin “Iterative deconvolve 3D” (la PSF usada se obtuvo utilizando los datos del microscopio y la cámara usados para obtener las imágenes). Posteriormente se hizo el conteo de los PBs con un macro específico para cada uno de los anticuerpos utilizados; el macro se dividió en 2 secciones; 1) se hizo una discretización entre la señal y el ruido con un umbral “threshold” (método “Otsu dark” para Dcp1 y “Entropy Dark” para Xrn1); 2) A continuación, se corrió el analizador de partículas pidiéndole al macro que arrojara los outlines (muestra una máscara con los puntos que está cuantificando), y al RoiManager (te permite usar la máscara para hacer cuantificaciones en la imagen original) y las mediciones de cada partícula contada (número de partículas contadas, tamaño de cada una, intensidad mínima, intensidad máxima y promedio de intensidad). Finalmente se contaron los núcleos, de tal forma que el número de PB se muestra como el número de PB contados por campo entre el número de núcleos (número de PB/célula).

Ensayos de Inmunoprecipitación

Se creció una monocapa confluyente de células MA104 en un frasco de 150 mm² y se infectó a una MOI de 5, las células se lavaron y se cosecharon mediante raspado a las 8 hpi, se sonicaron 4 veces por 5 segundos a 4°C, se colectó el extracto celular en 1 ml y se preclareó por incubación con 100 µl de Proteína-G acopladas a perlas magnéticas a 4°C por 1 hr, al terminar se retiraron las perlas magnéticas aplicando un campo magnético. 200 µl del extracto preclareado se incubó con cada uno de los anticuerpos indicados por 1 hr a 4°C en agitación, posteriormente se adicionaron perlas magnéticas acopladas a Proteína-G y se incubaron por 2 hr a 4°C en agitación. Después de este tiempo las perlas se lavaron 4 veces con buffer RIPA (1% tritón X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 150 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5). Finalmente, las perlas se dividieron en 2 tubos, uno se resuspendió en buffer Laemmli y se desnaturalizó a 100°C por 5 min, y las proteínas se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a

membranas para ser analizadas mediante WB con los mismos anticuerpos que se usaron para la inmunoprecipitación. Se realizó una purificación de RNA mediante trizol de la muestra del segundo tubo y se realizó un RT-PCR del segmento 10 a partir de 1 µg de RNA total, usando la transcriptasa reversa M-MuLV (NEBioLabs), y posteriormente se amplificó con la polimerasa Vent (NEBioLabs) usando los iniciadores YM10-5' (CAGACCCGG-GTACCTTTTAAAAGTTCTGTCC) y YM10-3' (CAGACCCGGGCGCGGTACATTAAGACCGTTC), el fragmento amplificado de ~700pb correspondiente al segmento 10 se corrió en un gel al 0.8% de TAE-agarosa, y se tiñó con bromuro de etidio. La imagen del gel se adquirió usando un equipo Typhoon FLA9500 (GE).

Semi-purificación de partículas virales

Se crecieron células MA104 en una placa de 6 pozos y se transfectaron con los siRNA mencionados, las células fueron infectadas 72 hrs pos-transfección con rotavirus RRV a una MOI de 5 y cosechadas a las 12 hpi por raspado en buffer TNC (10 mM Tris HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂). Estas células se sonicaron 3 veces por 20 segundos en hielo, y se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min para remover restos celulares. Se realizó una extracción con Freón del sobrenadante, y posteriormente se centrifugó a 40 000 rpm por 2 hrs a 4°C sobre un colchón de sacarosa al 40% en un rotor SW40. La pastilla celular que contenía a las partículas virales se resuspendió en 100 µl de buffer TNC, y se cuantificó la concentración de las proteínas totales con un Nanodrop y se realizaron ensayos de infectividad.

Resultados

La mayor parte de los resultados aquí relatados se publicaron en el artículo “Rotavirus RNAs sponge host cell RNA binding proteins and interfere with their subcellular localization” publicado en la revista “Virology” con fecha del 22 de Septiembre del 2018 (Anexo 1). Así como también se publicó el artículo de revisión “Stress Response and Translation Control in Rotavirus Infection” Publicado en la revista “Viruses” con fecha del 7 de Junio del 2016 (Anexo 1).

Aislamiento de complejos RNA viral- proteína con MS2-MBP

Para determinar qué proteínas celulares y virales interaccionan con los mRNAs del rotavirus, se realizó la purificación de complejos de RNA-proteína. Primero co-inmunoprecipitamos con anticuerpos dirigidos contra la proteína NSP3 que interacciona específicamente con el mRNA viral. Sin embargo, en estos ensayos de inmunoprecipitación precipitaban de manera inespecífica partículas virales, lo que no permitió discernir si las proteínas celulares inmunoprecipitadas estaban unidas al RNA viral o a la partícula viral. Como alternativa, se expresó y purificó el dominio de unión de RNA de la proteína NSP3 fusionado a un Tag de histidinas, con la intención de utilizarlo para purificar de una manera más limpia las proteínas de unión al mRNA viral. Desafortunadamente no logramos purificar eficientemente esta proteína recombinante, por lo que no continuamos con esta metodología.

La siguiente estrategia, se basó en utilizar una técnica que permite aislar de manera específica a un RNA blanco (Zhou and Reed 2003), a cual consiste en fusionar secuencias de RNA que contienen uno o más sitios de unión a la proteína MS2 al RNA de interés (Fig 2A), El RNA derivado de dicha fusión se deja interactuando con un lisado celular (Fig 2B). Para su purificación, se usan los sitios MS2 como anclaje a la proteína de fusión MS2-MBP (Maltose Binding Protein)(Fig 2C), misma que se puede purificar por afinidad mediante una resina de amilosa (Fig 2 D-E). De esta manera se puede purificar al RNA de interés con las proteínas a las que este asociado (Fig 2F).

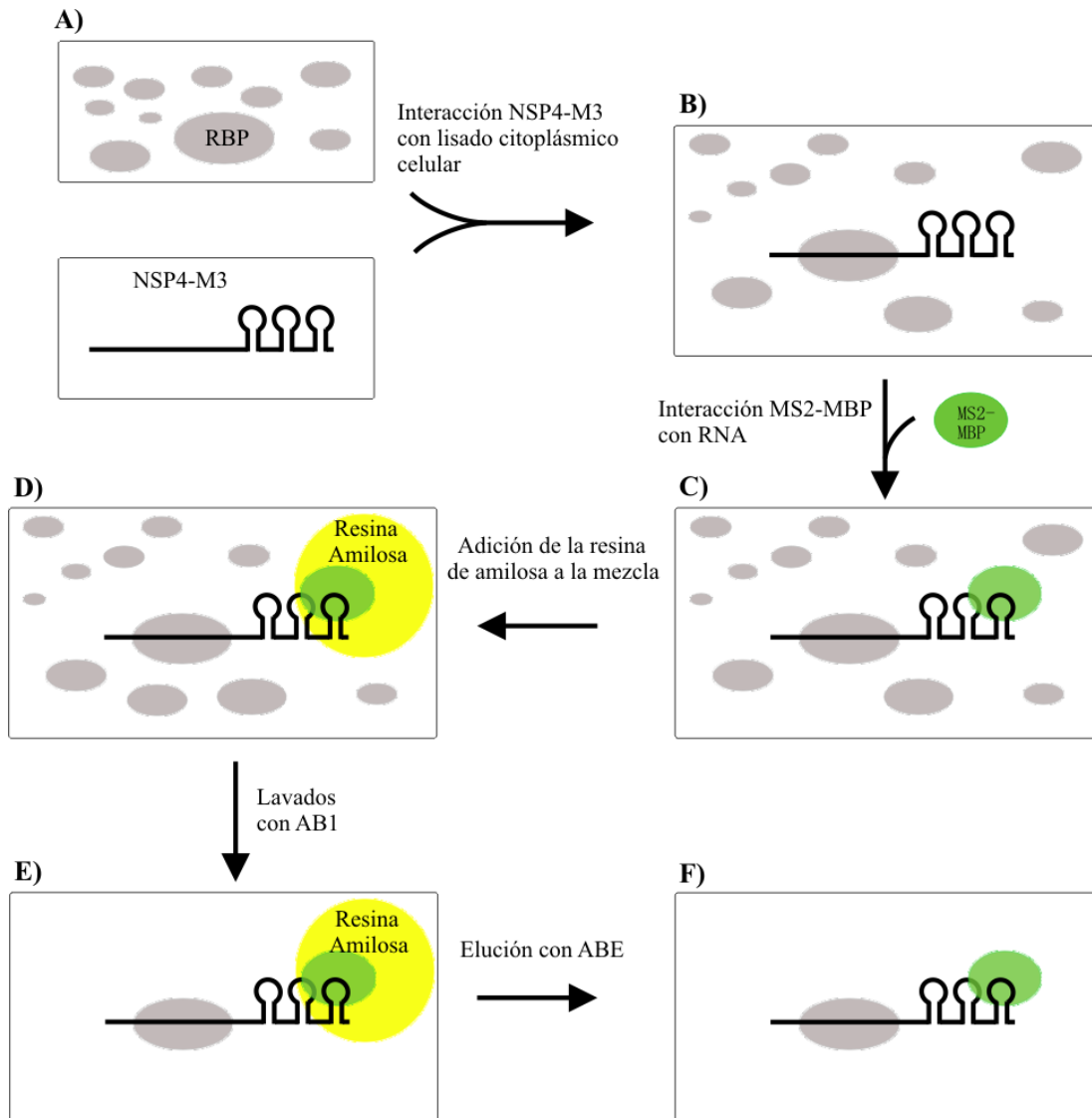


Figura 2. Esquema de la estrategia utilizada para la purificación de RBPs asociados a RNA viral.

A) y B) La construcción NSP4MS2 se asocia a RBPs reconocidos en la fracción citoplásmica de un lisado celular, **C)** la adición de la proteína de fusión MS2-MBP a la mezcla permite que reconozca los sitios MS2 en el RNA, **D)** La resina de Amilosa reconoce específicamente la región MBP de la proteína de fusión. **E)** El lavado de la resina elimina las moléculas no asociadas de manera específica al complejo RBP-NSP4M3-MS2MBP-Resina y finalmente **F)** se realiza una elución con ABE, el cual contiene una concentración de 10 mM de maltosa, lo que nos permite purificar de una manera específica al RNA unido a RBPs.

Con esta estrategia diseñamos una serie de construcciones en las que se fusionaron 3 sitios de unión para la proteína MS2-MBP a los segmentos 6 y 10 del genoma de RRV, que codifican para VP6 (VP6M3-3' y 5') y NSP4 (NSP4M3-3' y 5'), respectivamente (Fig. 3A). Esta estrategia nos permitió aislar selectivamente a los RNAs con los sitios de unión a MS2 mediante su interacción con la proteína de fusión MS2-MBP, de tal manera que purificaríamos a los RNAs quiméricos y con éstos a las proteínas celulares y virales que se encontraban unidos directa o indirectamente a éstos. Debido a que la localización de los sitios MS2 en los mRNA virales podrían alterar la unión de diferentes proteínas celulares o virales a los RNAs quiméricos, se generaron dos construcciones para cada uno de los RNAs seleccionados. En una construcción los sitios de unión a MS2 se encontraban en el extremo 3' mientras que en la segunda construcción estos sitios de unión se localizaban en el extremo 5' de los RNAs (Fig. 3A). Una vez construidos los plásmidos de cada una de las fusiones se procedió a su transcripción *in vitro* utilizando la polimerasa del fago T7, lo que nos permitió obtener los mRNAs quiméricos de cada construcción, obteniendo un rendimiento alto de RNA en este proceso.

Estandarización de los ensayos de Pull-Down del mRNA viral y proteínas.

Una vez obtenidas las construcciones fusionadas con los sitios de unión a MS2 y la proteína adaptadora MS2-MBP procedimos a realizar ensayos para demostrar si las construcciones de RNA virales quiméricos interactuaban con la proteína MS2-MBP y por lo tanto se podían utilizar para aislar a los complejos RNA-proteína (Zhou *et al.* 2002). Para esto, cosechamos células MA104 infectadas o no con RRV a una MOI de 5 a las 8 hpi con EDTA, y las lisamos por sonicación. Estos lisados se incubaron con las construcciones NSP4-MS2 para determinar que proteínas se unían al RNA de las construcciones. Como condiciones control, se utilizó el RNA del segmento 11 (NSP4), sintetizado *in vitro*, sin los sitios de unión a MS2. Este control nos aseguraba que las proteínas encontradas se estaban uniendo directamente a las construcciones con los sitios de unión a MS2. Como un segundo control, se colocó la proteína MS2-MBP sin RNA para poder determinar qué proteínas pudieran unirse directamente al RNA y no a la proteína MS2-MBP. Como una primera aproximación tratamos de ver si podíamos detectar proteínas unidas a las

construcciones mediante la tinción con Coomassie, la cual nos permite detectar la totalidad de proteínas unidas a nuestras construcciones aun que con una baja resolución, desgraciadamente no logramos ver ninguna proteína de unión al mRNA con esta tinción (Fig. 3B), indicando que si bien el RNA podría unirse a la proteína MS2-MBP, la concentración de las proteínas unidas a este mRNA podría ser muy baja para detectarlas mediante este método. Por lo tanto realizamos ensayos de WB para determinar si las proteínas virales NSP3 y VP1, previamente descritas como proteínas de unión al mRNA viral, podían ser detectadas en este ensayo (Taraporewala and Patton 2004; Curry *et al.* 2009; Gridley and Patton 2014). Esta prueba nos serviría como control positivo para corroborar que efectivamente podíamos detectar proteínas de unión al mRNA viral (Fig. 3C). De manera consistente, cuando evaluamos la unión de VP1 al mRNA viral, pudimos detectar a esta proteína por WB en el control positivo (lisado de células infectadas). Por otra parte, al incubar a las construcciones NSP4M3-3' y 5', no observamos la presencia de VP1 ni en células infectadas (control negativo) ni en células no infectadas (Fig. 3C). Por otro lado, al evaluar por WB la unión de NSP3 al mRNA viral, observamos señal al incubar el lisado total de células infectadas con la construcción NSP4M3-5'. No pudimos detectar la presencia de NSP3 al incubar a la construcción NSP4M3-3' con células infectadas o con células no infectadas. Este resultado tiene sentido ya que la proteína NSP3 solo se une a secuencias UGAC 3' terminales presentes en los transcritos virales (Poncet *et al.* 1994), por lo que esta proteína no es capaz de unirse a la construcción NSP4M3-3' que no contiene la secuencia UGAC al final del transcrito. Estos datos indican que este protocolo permite aislar proteínas virales unidas a las construcciones NSP4M3-3' y 5' de manera específica.

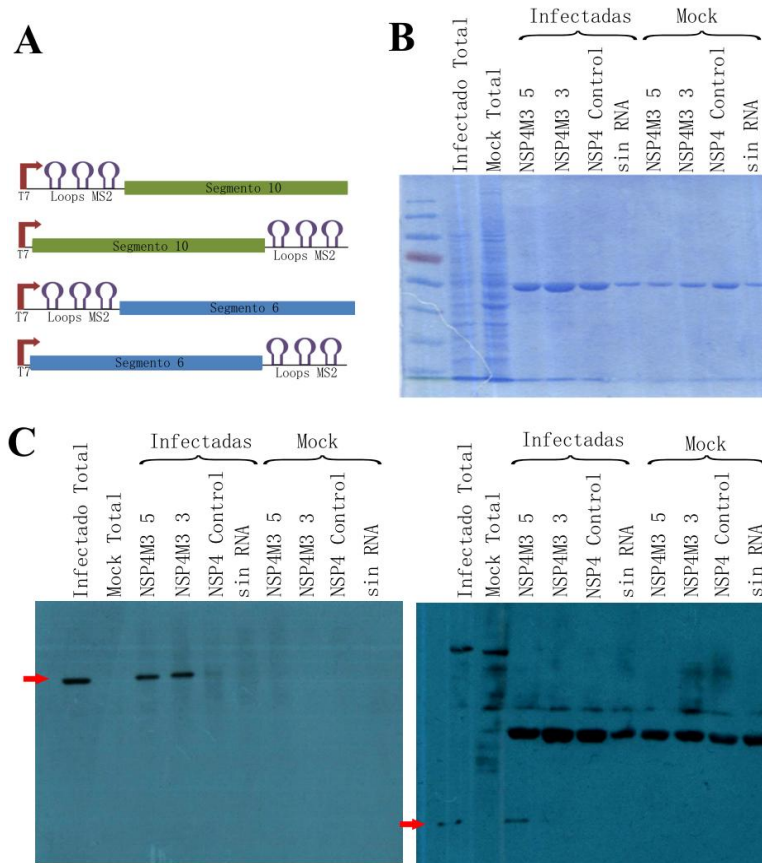


Figura 3. Obtención del RNAs MS2 y controles de detección de proteínas virales unidas a las construcciones NSP4M3-3' y 5'.

A) Representación esquemática de las construcciones realizadas para los segmentos 6 (VP6) y 10 (NSP4) en las que se fusionaron 3 sitios de unión a MS2 (loops MS2) tanto del lado 3' como del 5' para cada uno de los segmentos. **B)** Células MA104 fueron infectadas o no con RRV y se realizó la purificación de complejos proteína-RNA viral mediante MS2-MBP utilizando como controles negativos un RNA control sin regiones de unión a MS2 y una condición sin RNA, como controles positivos se utilizaron lisados totales de células infectadas y no infectadas (Mock). Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida y se tiñó con azul de Coomassie. **C)** Ensayos de Western blot para VP1 (flecha roja, panel izquierdo) y NSP3 (flecha roja, panel derecho) realizados con muestras obtenidas de un ensayo de purificación de complejos Proteína-RNA viral mediante MS2-MBP.

Purificación de los complejos proteínas-mRNA virales

Por otro lado, para saber si por medio de esta técnica podemos aislar proteínas celulares que se unen al RNA de rotavirus, decidimos buscar por WB a las proteínas celulares TIA1 y HuR, las cuales teníamos como candidatas a ser posibles proteínas de unión al RNA viral.

Como se ha mencionado, TIA1 es una proteína de unión a RNA que se encuentra predominantemente en el núcleo de las células. Sin embargo, se sabe que esta proteína se enriquece en el citoplasma en respuesta a varios tipos de estrés, uniéndose al 3'UTR del mRNA en sitios ricos en AU, formando un complejo de pre-inicio de la traducción no canónico pero traduccionalmente inactivo. Este tipo de mensajeros unidos a TIA1 se agregan y forman los gránulos de estrés (SG). Sabemos que durante la infección con rotavirus se produce un estrés a la célula, lo que lleva a la fosforilación de eIF2a, e induce la relocalización núcleo-citoplasma de TIA1. Sin embargo no hay formación de gránulos de estrés (Montero *et al.* 2008). Cabe mencionar que aún no sabemos cuál es el mecanismo por el cual los rotavirus previenen la formación de estos gránulos, y si el RNA o las proteínas virales tienen un papel en dicho proceso.

Por otra parte, HuR pertenece a la familia ELAV/Hu que está altamente conservada y que consta de 4 miembros, 3 de estos son predominantemente citoplásmicos y específicos de neuronas (HuB, HuC y HuD) mientras que HuR se expresa en el núcleo de prácticamente todas las células humanas. Cada una de estas proteínas poseen tres motivos de interacción con el RNA que reconocen y se unen a sitios ricos en AU (Simone and Keene 2013). En particular, se han descrito varias funciones para la proteína HuR, la cual tiene la capacidad de dar estabilidad y promover la traducción de sus RNA blancos (Doller *et al.* 2008) así como también puede participar en el proceso de exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma (Siddiqui and Borden 2012; Simone and Keene 2013). Datos del laboratorio han mostrado que gran parte de los mensajeros celulares altamente representados en fracciones polisomales son ricos en secuencias AU (Silva et al, datos no publicados), lo que sugiere que proteínas de unión a estos sitios podrían estar protegiéndolas y/o promoviendo su traducción. Por otro lado también se sabe que los UTRs de los 11 segmentos de rotavirus son ricos en secuencias AU, por lo que también podrían ser blanco de estas proteínas reguladoras.

Para explorar si las proteínas TIA1 y HuR reconocen específicamente las secuencias contenidas en las construcciones NSP4M3-3' y 5' se realizó una purificación de complejos proteína-RNA viral mediante MS2-MBP y posteriormente ensayos de WB para detectar a

éstas dos proteínas, como controles se utilizaron las condiciones con el RNA de NSP4 control y sin RNA, así como los lisados totales de células infectadas y no infectadas como controles (Fig. 4). En la figura 4 mostramos los WB en los que se detectó claramente la presencia de las proteínas HuR y TIA1 cuando utilizamos las construcciones NSP4M3-3' y NSP4M3-5' con lisados de células infectadas y no se observó en ninguno de los controles negativos, también se observó una banda muy tenue en células no infectadas que fueron incubadas y precipitadas con las construcciones. Aunque este dato debe ser corroborado por otras técnicas, estos resultados sugieren que tanto HuR como TIA1 podrían estar asociadas de manera específica con mRNAs virales durante la infección.

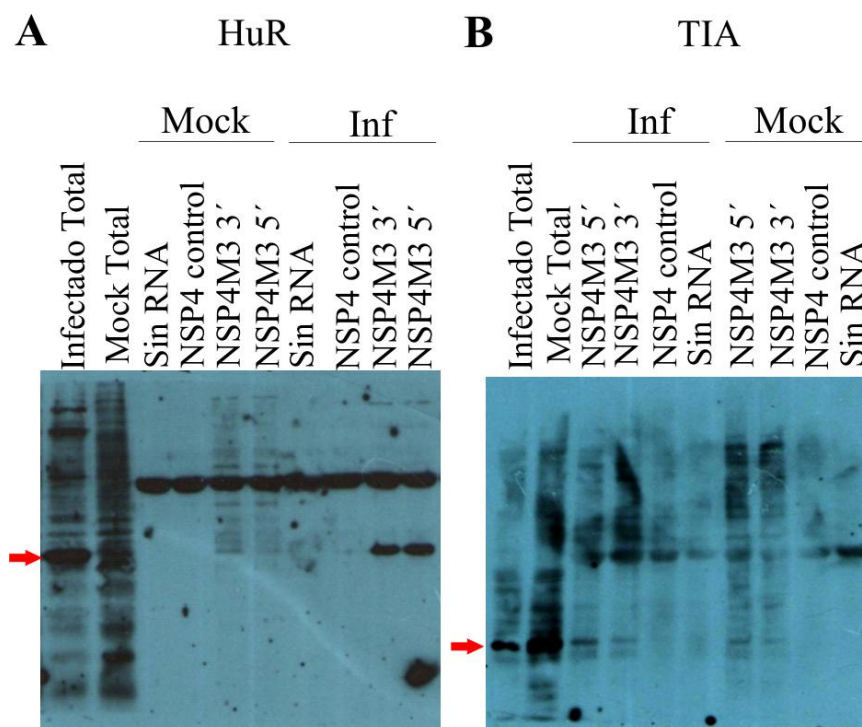


Figura 4. Las proteínas TIA1 y HuR interactúan con el RNA de RRV.

Western blot para las proteínas a) TIA1 y b) HuR (señalados por las flechas rojas) realizados con muestras obtenidas de ensayos de purificación de complejos Proteína-RNA viral mediante MS2-MBP.

Relocalización de HuR por infección de rotavirus RRV

Se ha reportado que HuR es una proteína de localización nuclear que se transloca al citoplasma en diferentes tipos de estrés (Doller *et al.* 2008). Para determinar la localización de esta proteína durante la infección con rotavirus, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia de células infectadas a 8 hpi o de células no infectadas, tiñendo a la proteína HuR con un anticuerpo monoclonal específico, y al mismo tiempo tiñendo a la proteína NSP2 que se encuentra en los viroplasmatas, como marcador de infección con un anticuerpo policlonal. Además, se utilizó DAPI para teñir los núcleos. En este experimento encontramos que la infección de las células MA104 por rotavirus RRV induce la translocación de la proteína HuR del núcleo hacia el citoplasma de la célula (Fig. 5). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los RNAs virales pueden tener interacción con distintas RBP celulares y por lo tanto, controlar la localización y tal vez también la función de algunas de estas proteínas.

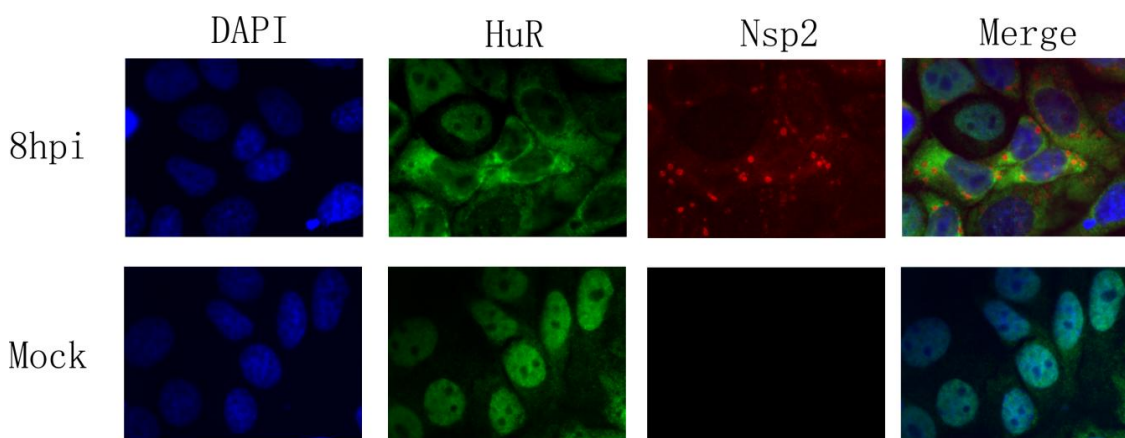


Figura 5. Relocalización de HuR en células infectadas.

Inmunofluorescencias de células MA104 infectadas o no (mock) con rotavirus RRV a una MOI de 5 a las 8 hpi, y marcadas utilizando anti-HuR (verde), anti-NSP2 (rojo) y Dapi (azul), en las cuales se observa que la proteína HuR se transloca al citoplasma debido a la infección con RRV.

Cuerpos de procesamiento durante la infección con rotavirus RRV

Hasta el momento nuestros resultados indican que las proteínas celulares HuR y TIA1 interaccionan con el mRNA viral. Por un lado sabemos que TIA1 es una proteína marcadora de gránulos de estrés, y como se ha mencionado anteriormente, aún cuando eIF2 α se encuentra fosforilada durante la infección estos gránulos no se forman. Por otra

parte, HuR es una proteína que se encuentra tanto en gránulos de estrés como en cuerpos de procesamiento o “P-bodies” (PBs). Como se ha mencionado antes, datos del laboratorio han mostrado que los SGs no se forman durante la infección de rotavirus. Sin embargo, aún no sabemos qué es lo que sucede con los PBs durante la infección por rotavirus.

Disgregación de PB durante la infección con rotavirus.

Dado que los PBs se encuentran presentes en el citoplasma de la célula de manera constitutiva y estos gránulos de RNA son estructuras que participan en la regulación de la vida media de los mRNAs a través de diversas RBPs y otras enzimas involucradas en el metabolismo del RNA, decidimos caracterizar el comportamiento de estas estructuras durante la infección con rotavirus. Para esto nos preguntamos qué sucedía con las proteínas Dcp1 y Xrn1 durante la infección, dos de los marcadores más representativos de estas estructuras. Xrn1 es una exonucleasa que se encarga de la degradación de los mRNA en dirección 5'-3', una vez que el complejo formado por Dcp1 y Dcp2 ha eliminado la estructura CAP del extremo 5' de los mensajeros.

Para caracterizar la localización de éstas dos enzimas representativas de los PBs, se realizaron inmunofluorescencias de células MA104 infectadas durante 4, 6, y 8 hpi, utilizando como control células no infectadas. En la figura 6 observamos que comparadas con las células no infectadas, la localización de éstas dos proteínas cambia a lo largo de la infección, ya que se observa un menor número de PBs en las células infectadas. Para tener datos cuantitativos, evaluamos el número de PBs por célula y observamos que este número disminuye hasta en un 70% conforme avanza la infección. También notamos que hubo un ligero aumento en la señal de fondo a lo largo del citoplasma, al compararlos con sus controles en células sin infectar.

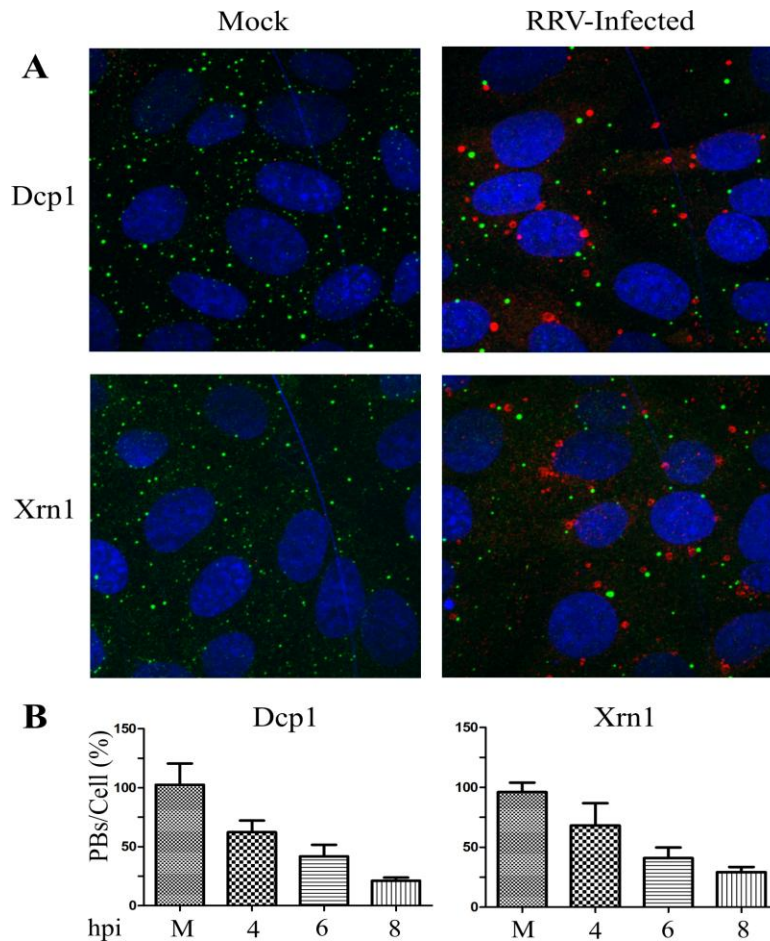


Figura 6. Desagregación de PBs teñidos con anticuerpos contra Dcp1 y Xrn1 en células MA104

A) Inmunofluorescencia de células MA104 no infectadas (mock) o infectadas y cosechadas a las 8 hpi. Como marcador de PBs se utilizó α -Dcp1 o α -Xrn1 (verde); como marcador de infección se tiñeron a los viroplasmos utilizando α -NSP2 (rojo); y el núcleo se marcó con DAPI (azul). **B)** Cuantificación de PBs por célula, los números mostrados representan al menos 300 células por condición.

La concentración de las proteínas Xrn1 y Dcp1 permanece constante durante la infección de rotavirus

La observación de PBs mediante inmunofluorescencias utilizando anticuerpos contra Dcp1 y Xrn1 nos mostró una disminución en su número en las células infectadas. Una posible explicación de este fenotipo podría ser que el número de PBs es menor debido a que la concentración de estas dos proteínas en las células infectadas disminuye, ya sea por degradación o por algún tipo de regulación traduccional. Para evaluar si este era el caso, analizamos la concentración de ambas proteínas durante la infección. Con este objetivo, infectamos células MA104 y las cosechamos a las 4, 6 u 8 hpi, posteriormente lisamos las células y realizamos ensayos de WB en los que detectamos a Dcp1 o Xrn1, y finalmente cuantificamos la concentración de las proteínas durante la infección (Fig. 7). Como control negativo utilizamos células no infectadas, y como control de carga detectamos la presencia de vimentina, utilizando anticuerpos específicos contra esta

proteína. Cuantificamos la concentración de estas proteínas por densitometría de las bandas detectadas en los WB, normalizando cada proteína con la concentración de vimentina encontrada en cada condición. Los resultados muestran que no hubo un cambio significativo en la concentración de ninguna de las dos proteínas a lo largo de la infección de rotavirus (Fig. 7), por lo que la disminución del número de PBs durante la infección no es debida a un cambio en la concentración de las proteínas Dcp1 o Xrn1.

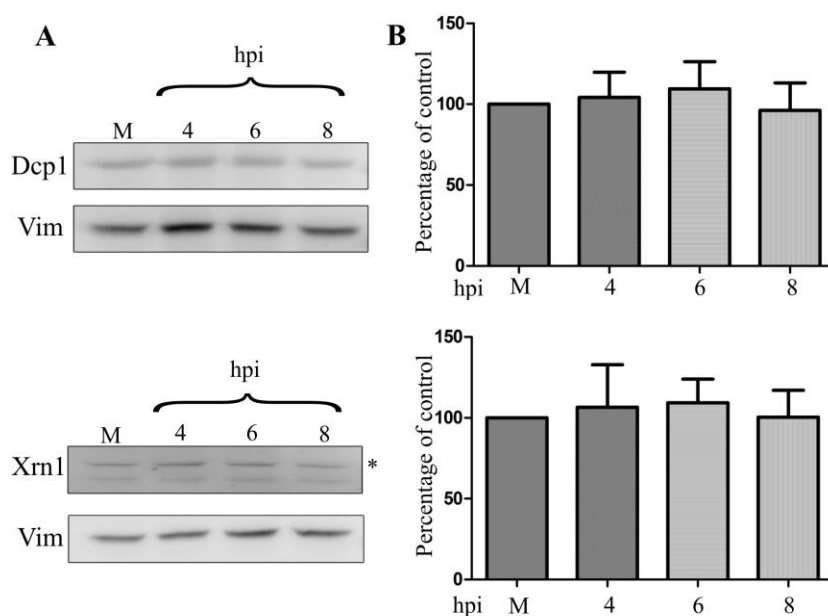


Figura 7. Cuantificación de la concentración celular de Dcp1 y Xrn1 total durante la infección de rotavirus.

A) WB representativos realizados para detectar Dcp1 o Xrn1 en células no infectadas (mock, M) o a las 4, 6, y 8 hpi en células infectadas, **B)** Cuantificación de las proteínas Dcp1 y Xrn1 realizadas por densitometría con ImageJ, los valores graficados se normalizaron con respecto a la concentración de Vimentina (Vim) encontrada en cada una de las condiciones y cada barra representa un triplicado. *Banda correspondiente a Xrn1

El número de PBs depende de la concentración del RNA viral en la célula

Dado a que la concentración de Dcp1 y Xrn1 se mantiene estable durante la infección con rotavirus, concluimos que la disminución en el número de PBs no es debido a la disminución de la concentración de estas proteínas. Por lo que nos preguntamos si el fenotipo de disminución de PBs marcados con Dcp1 y Xrn1 durante la infección se debe a que estas proteínas están interactuando con el mRNA viral. Para comprobar esta hipótesis realizamos un ensayo en el que mediante el silenciamiento de la polimerasa viral VP1 o de

VP3 se disminuyó la cantidad del mRNA viral producido en las células infectadas (Fig. 8A y B), y nos preguntamos si esta disminución puede contrarrestar el efecto de la infección sobre los PBs. Con este objetivo, transfectamos células MA104 con siRNAs dirigidos contra VP1, VP3 o con un siRNA irrelevante 72hrs antes de la infección y se realizaron inmunofluorescencias en la que se tiñó a NSP2 como marcador de viroplasmos, Dcp1 o Xrn1 para teñir PBs y DAPI para teñir núcleos. Como control se utilizaron células no infectadas. Como paso final, realizamos la cuantificación del número de PBs/célula de las imágenes tomadas. Encontramos que mientras que en las células infectadas tratadas con el siRNA irrelevante el número de PBs disminuyó a los mismos niveles anteriormente observados (Fig 8), cuando se silenció la expresión de VP1 o de VP3 se observó una recuperación del número de PBs cercano al 80% del número encontrado en las células no infectadas, lo que sugiere que la cantidad de mRNA viral durante la infección podría ser responsable de la disminución de estas estructuras durante la infección.

En contraste al hecho de que al silenciar VP3 y VP1, lleva a la disminución de la concentración de mRNA viral durante la infección, el silenciamiento de la proteína NSP3 provocó un aumento en la cantidad del mRNA viral (Fig. 8B). Por lo que, esperábamos que al aumentar la concentración del mRNA viral al disminuir la expresión de NSP3, deberíamos observar una mayor disminución en el número de PBs. En la figura 8 paneles C y D se muestran los resultados de estos ensayos en los que encontramos que en las células infectadas tratadas con el siRNA de NSP3, el número de PBs es ligeramente menor al número que se encuentra en las células infectadas tratadas con un siRNA irrelevante, confirmando nuestra hipótesis de que el número de PBs presentes en la células infectadas depende de la cantidad de RNA viral.

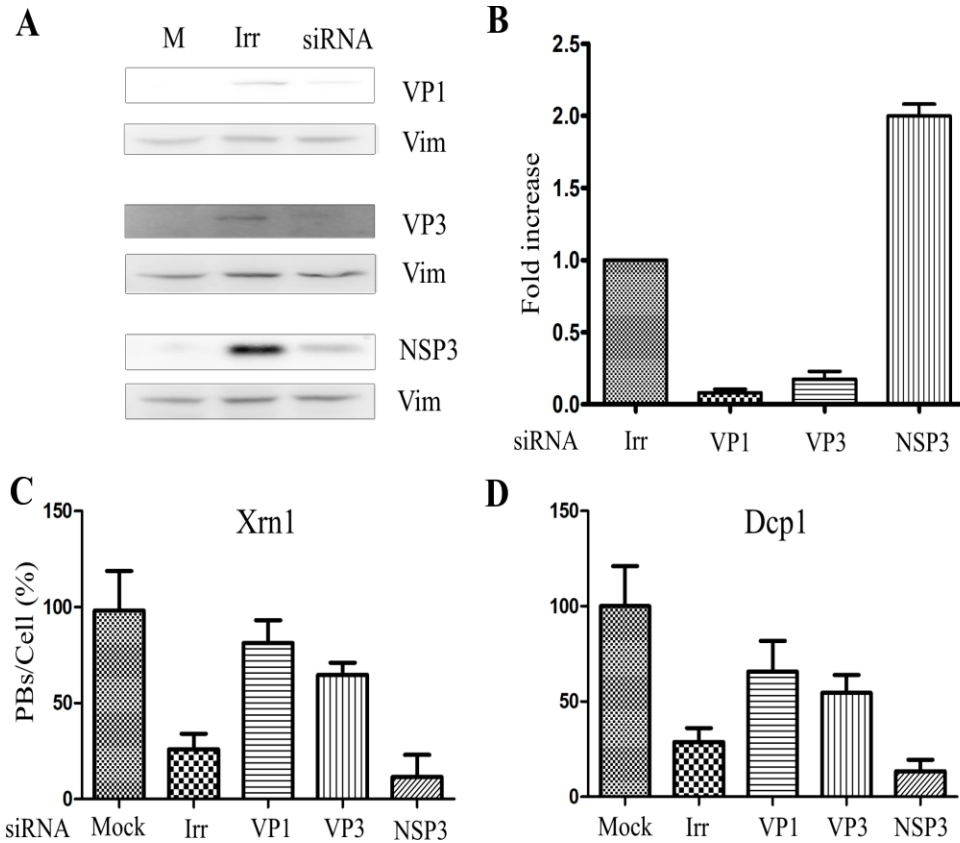


Figura 8. El efecto del virus sobre Dcp1 y Xrn1 se ve alterado por el silenciamiento de VP1, VP3 y NSP3.

A) Células MA104 fueron transfectadas con los siRNA indicados en cada caso, 72 hr post transfección las células fueron infectadas con RRV a una MOI de 5 y cosechadas a las 8 hpi, con el lisado obtenido se realizaron WB para detectar a las proteínas VP1, VP3, NSP3 y vimentina como control de carga. **B)** Cuantificación del mRNA viral del segmento 10 de rotavirus y del RNA ribosomal 18S por RT-qPCR, los resultados fueron analizados utilizando el método de ΔCT normalizando con los niveles del RNA 18S detectado en cada muestra. Los resultados están expresados como las veces de incremento del segmento 10 relativo a la muestra tratada con el siRR. Cuantificación del número de PBs marcados con **C)** Xrn1 o **D)** Dcp1 de células no infectadas (mock) o infectadas e interferidas con un siRNA irrelevante o contra VP1, VP3 o NSP3 y cosechadas a las 8 hpi. Cada barra representa el promedio de al menos 300 células.

Relocalización de las proteínas marcadoras de GW-Bodies.

Como mencionamos anteriormente, en los PBs se lleva a cabo la degradación de los mRNAs en dirección 5' a 3', y en otro tipo de PBs especializados, o GW-Bodies, se lleva a cabo principalmente el silenciamiento por miRNA o siRNAs. Hasta ahora las 2 proteínas que hemos estudiado participan en la vía de degradación de mRNA 5'-3' (Dcp1 y Xrn1), por lo que nos preguntamos si las proteínas de la vía de silenciamiento tienen el mismo comportamiento en células infectadas con rotavirus. Para esto, realizamos ensayos de

inmunofluorescencia para detectar a GW182 y Ago2, dos de las proteínas más importantes en el decaimiento de RNA. En estos ensayos se infectaron células MA104, se cosecharon a las 8 hpi, y posteriormente se hizo un ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos α GW182 o α Ago2 como marcadores de GW-Bodies. Como marcador de infección se utilizó el anticuerpo α Nsp2 para teñir viroplasmos y finalmente se utilizó DAPI para teñir el núcleo de la célula. Como control se utilizaron células no infectadas. La figura 9 muestra que las proteínas de la vía de decaimiento de RNA no parecen comportarse de la misma forma que las proteínas de los PBs, ya que en este caso no se puede observar una disminución en el número de estas estructuras. Sin embargo, sí se observa una relocalización de ambas proteínas; en el caso de GW182, la abundancia de esta proteína parece aumentar y parte de la proteína se relocaliza en el interior de los viroplasmos; mientras que en el caso de Ago2, la marca también se redistribuye pero en este caso la mayor parte de la proteína parece estar rodeando a los viroplasmos

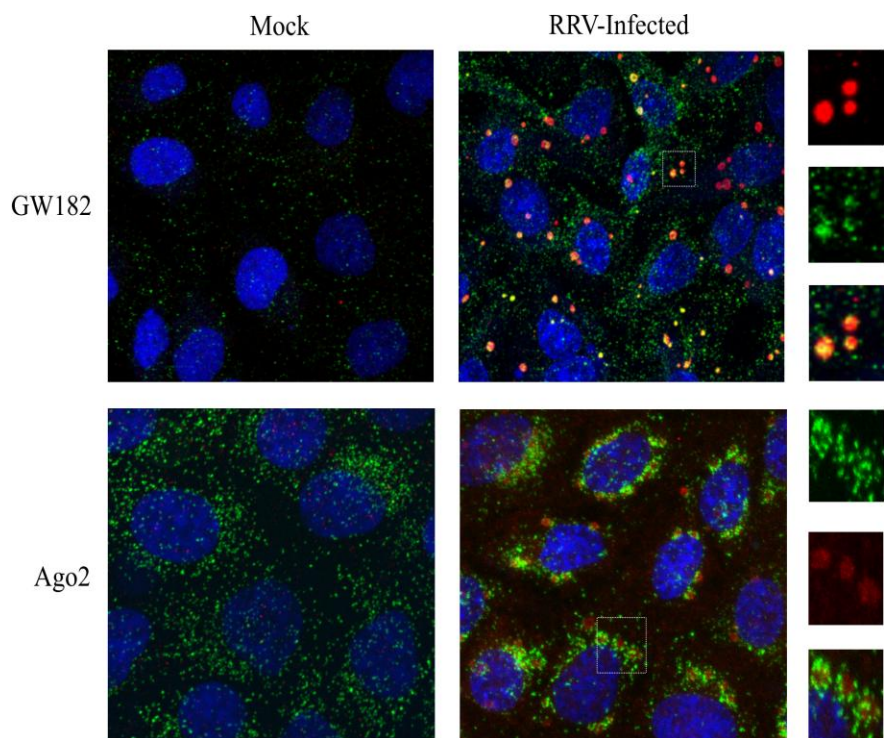


Figura 9. La infección con rotavirus RRV lleva a la relocalización de las proteínas GW182 y Ago2.

Células MA104 se crecieron a confluencia sobre cubreobjetos y fueron infectadas o no con rotavirus RRV a una MOI de 5 y se cosecharon a las 8 hpi, las células se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia en la que se detectó a las proteínas GW182 y Ago2 (verde), las cuales se utilizaron como marcadoras de los GW-Bodies. Como marcador de infección se tiñeron los viroplasmos con α NSP2 (rojo); y el núcleo con DAPI (azul). Las imágenes muestran un cambio en la localización de ambas proteínas

debido a la infección de RRV. Las imágenes mostradas son la suma de todos los cortes confocales obtenidos con el microscopio "Olympus Fluo-view 1000 multifotonic".

La relocalización de las proteínas marcadoras de los GW-bodies también se debe a la concentración del RNA viral en las células infectadas

En el experimento anterior observamos que tanto GW182 como Ago2 se relocalizan a los viroplasma. Si tomamos en cuenta que en estos sitios es donde se da el proceso de transcripción viral, entonces podríamos pensar que la concentración local de mRNA viral en el viroplasma y alrededor de este tendería a ser mayor, lo que podría ser el factor que conlleve la relocalización tanto de GW182 como de Ago2 a estos sitios. Por lo tanto, la relocalización de ambas proteínas también podría deberse a la concentración del mRNA viral. Para corroborar esta hipótesis realizamos una serie de inmunofluorescencias de células tratadas con interferentes para las proteínas virales VP1 y VP3 para disminuir la concentración de RNA viral, observando la localización de las proteínas GW182 y Ago2 mediante microscopía de confocal (Fig. 10). Encontramos que en las células infectadas tratadas con el siRNA irrelevante se observa la relocalización de GW182 o Ago2 hacia los viroplasma descritos en los experimentos anteriores (Fig. 10), mientras que en las condiciones en las que se silenció a la proteína VP1 o a VP3 (llevando a la disminución de la concentración de mRNA viral) se observó que el fenotipo de relocalización de GW182 y de Ago2 se revirtió casi completamente (Fig. 10). Estos datos apuntan a que el cambio de localización de estas proteínas se debe a algún proceso mediado por el RNA viral.

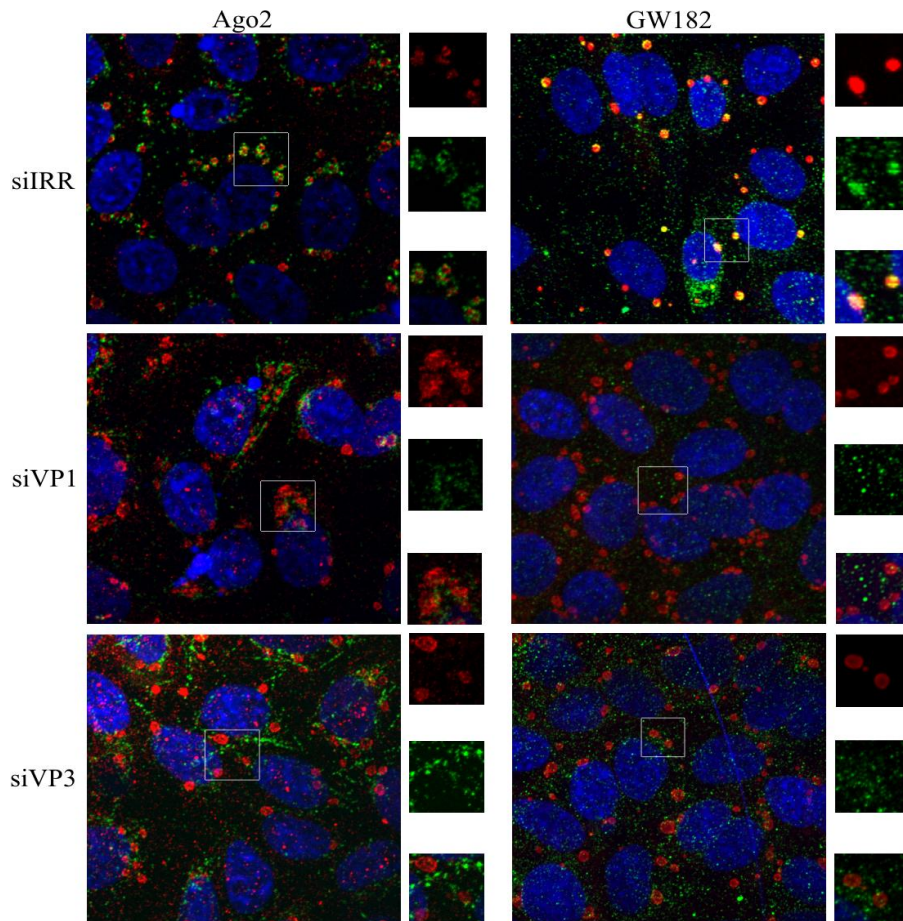


Figura 10. La relocalización de las proteínas GW182 y Ago2 se debe a la concentración del mRNA viral

Células MA104 se crecieron a confluencia sobre cubreobjetos y se trataron con los siRNA indicados para cada caso, 72 h post transfección se infectaron con rotavirus RRV a una MOI de 5 durante 8 hrs, se realizó una inmunofluorescencia tiñendo con anticuerpos contra las proteínas GW182 o Ago2 (verde); a los viroplasmos con NSP2 como marcador de infección (rojo); y el núcleo con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son la suma de todos los cortes confocales obtenidos con el microscopio “3I Marianas spinning disk”.

La concentración intracelular de Ago2 aumenta durante la infección por Rotavirus

En las inmunofluorescencias de GW182 y Ago2 se observa que aparentemente hay un aumento en la señal de las 2 proteínas. Esto podría ser un indicativo de que la concentración de estas proteínas se incrementa durante la infección. Para explorar si este era el caso, realizamos ensayos de WB para determinar la concentración de la proteína Ago2 en células infectadas o no infectadas (Fig. 11). Para esto se realizó la infección de células MA104 cosechadas a 4, 6 y 8 hpi y como control se utilizaron células no infectadas. Posteriormente las muestras se corrieron electroforéticamente y se realizó un WB para

detectar a Ago2, utilizando a la proteína vimentina como control de carga. Por último, se cuantificó la cantidad de proteína de Ago2 por densitometría para cada una de las condiciones normalizando los datos para cada caso con su control de vimentina. Los datos muestran que la concentración de la proteína Ago2 aumenta un 50% a las 8 hpi al compararla con las células no infectadas (Fig. 11). No pudimos realizar este tipo de ensayos con la proteína GW182 dado que los anticuerpos que tenemos reaccionan muy mal por WB y por lo tanto no fue posible hacer una cuantificación fidedigna de esta proteína.

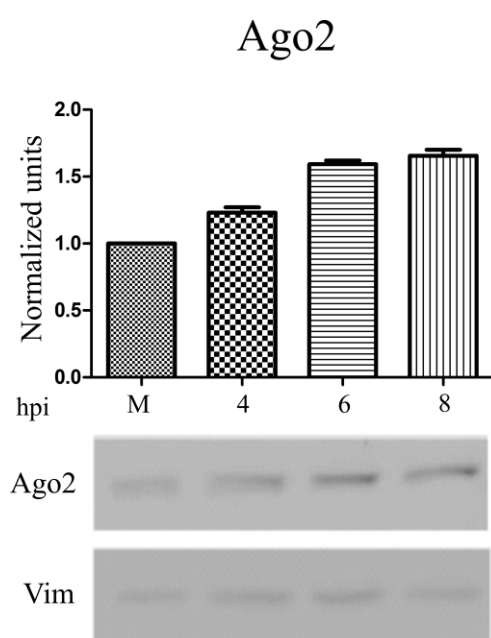


Figura 11. La concentración de la proteína Ago2 aumenta durante la infección con rotavirus RRV

Células MA104 fueron infectadas con RRV y cosechadas a 4, 6 y 8 hpi, se lisaron y las muestras se corrieron por un gel de SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar un WB para detectar Ago2, utilizando a vimentina como control de carga. Para la cuantificación, las imágenes fueron digitalizadas y analizadas por densitometría utilizando el software image Studio de LI-COR Bioscience. La gráfica muestra la cuantificación de Ago2 de 3 experimentos independientes y las barras de error muestran la desviación estándar para cada caso, abajo se muestran WB representativos contra Ago2 y vimentina respectivamente.

Las RBPs celulares interactúan con el mRNA viral.

Hasta el momento hemos demostrado que varias RBP cambian su localización en la célula y que este cambio depende de la concentración del mRNA viral, lo cual sugiere que el mRNA viral podría tener un efecto de esponja sobre estas RBPs, atrapándolas de manera inespecífica y alterando su localización celular. Para demostrar que efectivamente existe una asociación entre los RNAs virales y la RBPs caracterizadas en este estudio, realizamos ensayos de inmunoprecipitación en células infectadas o no infectadas con

anticuerpos dirigidos contra Dcp1, Xrn1, HuR y Ago2, para posteriormente detectar mRNA viral mediante ensayos de RT-PCR (El anticuerpo contra GW182 tampoco funcionó en este tipo de ensayos por lo que no se utilizó). Como control se realizaron inmunoprecipitaciones utilizando dos anticuerpos dirigidos contra proteínas que no interactúan con RNA, como son Hsp70 y PP1, así como una condición en la que se utilizó un anticuerpo preinmune de ratón. Las inmunoprecipitaciones fueron analizadas mediante WB con los mismos anticuerpos utilizados para la IPP para corroborar que logramos inmunoprecipitarlas correctamente (Fig. 12A). Como paso final, amplificamos por RT-PCR el mRNA viral correspondiente al segmento 10 mediante (Fig. 12B). Como era de esperarse no encontramos RNA viral en ninguno de los controles, mientras, que detectamos la presencia del RNA correspondiente al segmento 10 en los inmunoprecipitados de las distintas RBPs (Fig. 12B). Estos datos demuestran que el RNA viral se asocia con los RBP caracterizados en este trabajo y apoya la idea de que el RNA viral se encuentra funcionando como esponja que absorbe varias de las RBPs celulares.

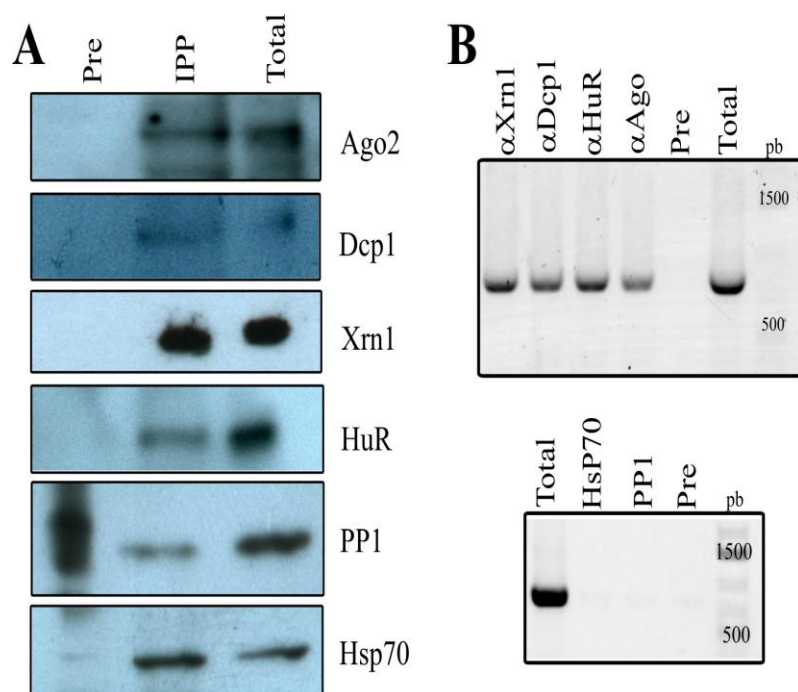


Figura 12. El RNA viral se une a Xrn1, Dcp1, Ago2 y HuR en células infectadas con rotavirus.

Las células MA104 se cultivaron a confluencia en frascos de 150 mm² y se infectaron con RRV a una MOI de 5 y cosechadas a las 8 hpi, se sonicaron y el lisado celular se inmunoprecipitó con los anticuerpos indicados o con un suero preinmune como control. **A)** Los lisados totales y los IPPs se corrieron en un gel de SDS10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa donde se detectaron a las proteínas indicadas mediante WB, o **B)** el RNA presente en los IPPs o lisados totales fue extraído mediante trizol, y el RNA viral correspondiente al segmento 10 (~700pb) se amplificó mediante RT-PCR y se detectó en geles de agarosa.

Las proteínas de los GW-bodies y PB tienen un papel durante la infección de rotavirus

Una vez que determinamos los efectos de la infección de rotavirus sobre las proteínas Dcp1, Xrn1, GW182 Ago2 y HuR, nos preguntamos si estas proteínas tienen algún papel durante la infección. Para responder esta pregunta estudiamos el efecto de inhibir la expresión de estas proteínas sobre la infectividad y la progenie del virus (Fig. 13). Para esto, transfectamos células con los siRNAs dirigidos contra Xrn1, Dcp1, Ago2, HuR y un siRNA irrelevante (Fig 13A), y cuantificamos a la progenie viral. Las células silenciadas se infectaron con RRV por 15 hrs a una MOI de 5, se lisaron por congelamiento y se tituló el virus producido mediante ensayos de inmunoperoxidasa (Fig. 13B). Para el ensayo de infectividad las células se infectaron con RRV a una MOI de 0.1 durante y se cosecharon a las 15 hpi, posteriormente se fijaron y se midió el título viral mediante un ensayo de inmunoperoxidasa (Fig. 13C). Los datos mostrados en los paneles B y C presentados en la figura 13 se normalizaron usando la condición de células infectadas silenciadas con un interferente irrelevante. El ensayo de infectividad mostró que el silenciamiento de Xrn1 o el de Dcp1 no tienen ningún efecto visible durante el proceso de entrada o el establecimiento de la infección de rotavirus. En contraste, observamos que la progenie viral obtenida de células silenciadas para Xrn1 mostró 400% de aumento, mientras que la producción de virus en el silenciamiento de Dcp1 aumentó al doble con respecto del control. Por otro lado, el silenciamiento de Ago2 provocó un aumento al 200% en la infectividad y un 400% en la progenie viral. Al contrario, las células silenciadas con GW182 tienen una disminución en la infectividad del virus. Sin embargo, la progenie viral observada con este silenciamiento no presenta cambios significativos al compararlos con el control. Por último, las células silenciadas para la proteína HuR presentaron un 60% de reducción en la progenie viral y aproximadamente un 50% en la infectividad.

Xrn1 es la proteína celular que se encarga de la degradación de los mRNAs en dirección 5'-3' reconociendo el grupo fosfato de los mRNAs sin CAP, por lo que aunque Xrn1 se relocaliza hacia el citoplasma durante la infección de rotavirus, esta proteína podría mantener su actividad y degradar mensajeros virales lo que explicaría la disminución de la progenie infecciosa. Cabe recalcar que, aunque la actividad de Dcp1 se

encuentra río arriba de la de Xrn1, al silenciar dicha proteína la progenie no aumenta a niveles equiparables de la condición de Xrn1 (Fig. 13B). Por otro lado, GW182 al igual que Ago2 son parte del complejo RISC, la maquinaria encargada del decaimiento de mRNA vía miRNAs y siRNA. En el caso de GW182 se observa una disminución de la infectividad pero no en la progenie de rotavirus, estos datos en conjunto con lo observado en las imágenes obtenidas por microscopia nos dicen que el secuestro de esta proteína a viroplasma podría ser importante para la consolidación de la infección. Sin embargo, los datos obtenidos hasta ahora no son suficientes para responder cual es la función de Gw182 durante la infección. Por otra parte, el silenciamiento de Ago2 lleva a un incremento de la infectividad y de la progenie viral, lo que nos sugiere que esta proteína funciona como parte de la defensa celular. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, HuR es una proteína encargada de la estabilización de los mRNAs, por lo que el observar un decremento de la progenie y la infectividad del virus nos da la idea de que esta proteína podría funcionar como un estabilizador de mRNA viral. Sí esto es verdad, el silenciarla llevaría a la degradación de mensajeros virales.

Los datos obtenidos en los ensayos de infectividad y progenie viral nos muestran que a excepción de HuR, las proteínas de PBs pueden limitar de alguna manera la infección de rotavirus RRV. Sin embargo, los datos obtenidos hasta ahora no son suficientes para proponer algún mecanismo, debido a que las proteínas de PBs son en general proteínas que regulan a los RNAs. Nosotros proponemos que su actividad está relacionado con el RNA viral durante el ciclo de infección de rotavirus, por lo que realizamos cuantificaciones de la concentración de RNA viral en células silenciadas para las proteínas de PBs a las 8 hpi mediante PCRs en tiempo real cuantificando al segmento 10, lo que nos permitió detectar cambios en la concentración del mensajero viral en células carentes de las distintas RBP de los PBs (Fig. 13D). Los datos no muestran ningún cambio aparente en la concentración de RNA viral al silenciar a las proteínas Dcp1 o GW182, mientras que en los silenciamiento de Xrn1 y Ago2 sí se observaron cambios. En las células silenciadas para Xrn1 se detectó un aumento en la concentración del RNA viral. Este dato

sugiere que la deslocalización de esta proteína hacia el citoplasma no inhibe su función de RNasa, por lo que podría continuar degradando al RNA viral. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el silenciamiento de Dcp1 no provocó un cambio aparente en la concentración del RNA. Estos dos datos podrían parecer contrarios ya que la actividad de RNasa de Xrn1 es dependiente de la actividad decapping de Dcp1. Sin embargo, trabajos recientes del laboratorio muestran la existencia de un “pool” grande de RNAs virales sin CAP, por lo que en este caso, la degradación de los RNAs virales por Xrn1 parecería restringirse al RNA viral no capeado. Por otro lado, las células silenciadas para Ago2 mostraron un decremento en la concentración del RNA viral, ya que Ago2 forma parte de la maquinaria de RISC la cual es encargada de un tipo de degradación de mRNA, por lo que se esperaría que la concentración de RNA incrementara al silenciar a dicha proteína. Considerando lo anterior, el decremento de la concentración del RNA viral observado en este experimento es sorprendente, ya que este experimento descarta la posibilidad de que el incremento en la progenie viral y en la infectividad observado en la Figura 13 paneles B y C, sean debidos a cambios provocados en la concentración del RNA viral. Una posible explicación que engloba ambos resultados, es que de alguna manera Ago2 protege al RNA viral de degradación o lo estabiliza a la vez que imposibilita la utilización del mRNA viral al que se encuentre unido para su encapsidación. Para probar esta hipótesis, se realizó una semipurificación de partículas virales de células silenciadas para Ago2 o tratadas con un siIRR (Fig 13 E), en estos experimentos encontramos que hay 2 veces más partículas virales infecciosas por cada μg de proteína en las células que fueron silenciadas para Ago2 en comparación con las células tratadas con los siRNAs irrelevantes, lo cual sugiere que la encapsidación de partículas virales es más eficiente en ausencia de la proteína Ago2.

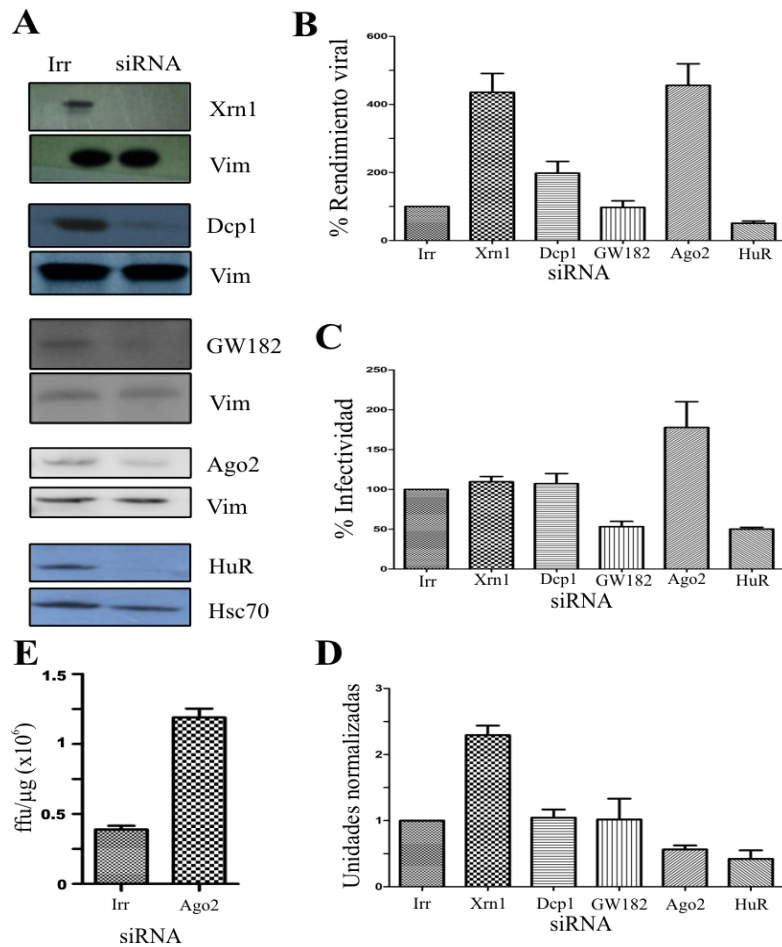


Figura 13. Efecto de los RBPs sobre el ciclo de infección de rotavirus.

A) Las células MA104 se transfectaron con el siRNA indicado y 72h post transfección se infectaron con RRV a una MOI de 5 por 8 h, las células se lisaron y se corrieron en un gel de SDS, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y las proteínas indicadas se detectaron mediante WB normalizando los datos por la concentración endógena de Vimentina o HSC70. **B)** Las células fueron tratadas como se describe en el panel **A)** y cosechadas a las 15 hpi y el título fue determinado por un ensayo de inmunoperoxidasa. **C)** pozos paralelos de células MA104 fueron silenciadas para cada uno de los siRNAs indicados en cada condición y a las 72h post transfección se infectaron con RRV hasta las 15hpi, el título fue medido por ensayos de peroxidasa **D)** El RNA de las células fue extraído con trizol y los niveles de RNA de rotavirus correspondiente al segmento 10 y al RNA 18S fue cuantificado mediante RT-qPCR, el resultado fue normalizado con respecto a la concentración del RNA 18S de cada condición y la gráfica se encuentra expresada como la cantidad de RNA encontrada en cada condición respecto a la condición de células tratadas con el siIRR. **E)** partículas virales fueron semipurificadas de células infectadas con rotavirus RRV que fueron silenciadas para Ago2 o con un siIRR, se determinó su concentración y su título viral mediante ensayos de inmunoperoxidasa, en la gráfica el título se encuentra expresado como unidades formadoras de foco por μ g de proteína.

Discusión

Interacciones Proteínas-RNA viral.

Con el paso del tiempo la forma de ver a la molécula de RNA ha ido cambiando de ser considerada simplemente como una molécula mensajera de la información genética, a una visión cada vez es más clara sobre la relevancia que puede llegar a tener el RNA en los procesos biológicos de las células, e incluso en la forma en la que interactúa la célula con su entorno, incluyendo posibles organismos patógenos como los virus. En general, las cápsides virales tienen un espacio muy limitado, por lo que el espacio del virión se debe aprovechar al máximo. Tanto las proteínas como el genoma que conforman al virión son de suma importancia para el establecimiento de una infección exitosa. Por lo que la cápside del rotavirus ha evolucionado para activar la transcripción de los mensajeros virales inmediatamente después de acceder al citoplasma celular. Estos mensajeros sirven inicialmente para producir las proteínas virales en citoplasma, y estas a su vez son utilizadas para llevar a cabo la replicación del material genético viral en los viroplasmos. Sin embargo, aparte de las funciones mencionadas como mensajero para la síntesis de proteínas y como templado para la replicación del genoma del virus, hasta ahora no se han atribuido otras funciones a los mensajeros virales, ni se han descrito las interacciones que puede tener el RNA viral con las proteínas celulares durante la infección. La primera pregunta que nos realizamos durante este proyecto, fue justamente cuál era el interactoma del RNA viral, ya que al identificar a las proteínas que interactúan con el RNA viral, podríamos darnos una idea de otras posibles funciones del RNA de rotavirus. Para contestar esta incógnita, desarrollamos una serie de sondas correspondientes a los segmentos 10 y 6 del genoma viral acoplados a 3 asas (loops) de MS2, los cuales nos sirvieron para aislar de manera selectiva las proteínas que interactuaban con los RNAs virales. Con esta técnica logramos detectar 2 proteínas celulares unidas al mRNA viral: HuR y TIA1.

Cuando caracterizamos la localización de HuR durante la infección con rotavirus encontramos que, como consecuencia de la infección, ocurre una relocalización de la proteína de HuR, que normalmente tiene una localización nuclear en células no infectadas, hacia el citoplasma celular. Esta observación nos pareció muy interesante. Sin embargo, aún es necesario realizar experimentos que nos permitan dilucidar cuál el mecanismo por el cual se realiza dicha translocación. Hasta el momento sabemos que la translocación de HuR ocurre de manera dependiente de CRM1 a través del poro nuclear o de manera independiente de CRM1 mediada por HNS. Por otra parte, en nuestro laboratorio encontramos que no hay translocación de HuR al silenciar a la polimerasa viral VP1, lo cual nos sugiere que dicha translocación puede ser provocada por la alta concentración de RNA viral que se encuentra en el citoplasma de las células infectadas. Estos resultados son intrigantes, ya que aunque se ha reportado que la translocación de HuR ocurre como respuesta al estrés, no hay reportes en los que el estrés provocado por dsRNA provoque dicha translocación. Es importante mencionar que aunque durante la infección de rotavirus RIGI y MDA5 responden al dsRNA, también se enciende la maquinaria de estrés de RE (Trujillo-Alonso *et al.* 2011). Además, también se ha observado el incremento en el nivel de citocinas, el cual se sabe que provoca la translocación núcleo citoplásmica de HuR en otros sistemas. Considerando lo anterior, sería importante realizar un estudio más profundo sobre cuál es el estímulo responsable del cambio de localización de esta proteína. Otro punto importante fue la observación de que el silenciar HuR ocurría una disminución en la progenie viral infecciosa producida, así como también en la concentración del mRNA viral. Estos datos, en conjunto con la observación de que el mRNA viral de rotavirus se asocia con HuR, sugieren que esta proteína estabiliza a los mRNAs del rotavirus al interactuar con ellos. Es importante mencionar que en la literatura se ha reportado que el mRNA del virus *Sindbis* actúa como una esponja que atrapa a la HuR secuestrándola y previniendo su unión con sus blancos celulares, así como inhibiendo los procesos de splicing y poliadenilación dependientes de esta proteína. Considerando lo anterior, aunque los datos mostrados en este trabajo sugieren que RRV pudiera estar haciendo lo mismo, es importante realizar experimentos que demuestren que el mRNA de

Rotavirus también utiliza este mecanismo. Otro punto interesante es que HuR puede sufrir distintas modificaciones postraduccionales, como lo son las fosforilaciones, metilaciones, ubiquitinación, NEDDilación y cortes proteolíticos. Se sabe que cada una de estas modificaciones podría estar regulando la función de esta proteína, por lo que también sería muy importante determinar qué tipo de modificaciones sufre HuR durante la infección de rotavirus.

Por otro lado, datos previos de nuestro laboratorio (Montero *et al.* 2008) mostraron que la proteína TIA1 se transloca al citoplasma durante la infección de rotavirus, pero a pesar de esto, no hay formación de SGs durante la infección. En el mismo trabajo la Dra. Montero también demostró que al silenciar a la proteína VP3, el virus se vuelve incapaz de prevenir la formación de los SGs (Datos no publicados, tesis H Montero). Este dato sugiere que el efecto esponja del mRNA viral sobre las proteínas celulares podría ser el responsable de la falta de los SGs durante la infección de rotavirus. De manera interesante, en este trabajo se observó que la translocación núcleo citoplasma de la proteína TIA1 se mantiene en las células silenciadas para VP3 (disminuyendo la concentración de mRNA viral), por lo que la translocación de TIA1 parecería no ser dependiente de la concentración de mRNA viral. Estas observaciones abren nuevas preguntas acerca de las diferencias en los mecanismos de translocación de TIA1 y HuR durante la infección con rotavirus, ya que aparentemente la translocación de HuR al citoplasma correlaciona con la concentración del mRNA viral en el citoplasma, mientras que la de TIA1 no. Estas vías quedan para ser exploradas en trabajos posteriores.

PBs, degradación de RNA y rotavirus

Como se ha mencionado, los PBs son agregados citoplásmicos de mRNA y RBPs en los cuales se lleva a cabo la regulación de los RNA mensajeros. Las principales proteínas marcadoras de estas estructuras son: Dcp1, Xrn1, Edc3 y Lsm4; entre otras. Por antecedentes sabemos que tanto los virus de DNA (poliomavirus y herpes) como de RNA (Influenza, y flavivirus) causan la disminución del número de PBs durante la infección

(revisado en (Lloyd 2013)). En este trabajo demostramos que el rotavirus RRV también es capaz de disminuir progresivamente el número de PBs durante la infección.

El control del número de PBs durante una infección puede ser beneficioso para un virus, debido a que los PBs son centros reguladores de la expresión y degradación de mensajeros, por lo que disminuir el número de PBs puede ser beneficioso durante la infección para controlar la expresión de ciertos mensajeros celulares, la degradación de otros mensajeros y además promover la expresión de sus propios mensajeros. Con el avance de la investigación en este tema se ha observado que los virus han desarrollado distintos métodos para controlar o eliminar a los PBs durante el ciclo infeccioso (Beckham and Parker 2008). Dentro de los mecanismos utilizados por los virus para bloquear la formación de los PBs se encuentran la degradación y el secuestro de proteínas esenciales para la formación de dichas estructuras (Lloyd 2013). Las cuantificaciones de los PBs en células en las que se modificó la concentración de mRNA viral mediante los silenciamientos de VP1, VP3 y NSP3 mostraron que la disminución del número de PBs que se observa durante la infección de rotavirus RRV en células MA104 depende de la concentración de mRNA viral. Además, los datos de las inmunoprecipitaciones de los RBP virales mostraron la asociación de las proteínas Dcp1 y Xrn1 con el mRNA viral. Estos datos en conjunto muestran que la disminución del número de PB se debe al efecto esponja del RNA (descrito en (Charley and Wilusz 2014)). En el reporte antes mencionado se propuso que las altas concentraciones del mRNA viral en las células infectadas pueden unirse, específicamente o no, a las RBPs que forman a los PBs, disminuyendo su cantidad durante la infección.

Al medir la progenie viral de células silenciadas para las proteínas Dcp1 y Xrn1 encontramos un aumento en el número de virus infecciosos producidos en ambas condiciones, lo que sugiere que estas proteínas son parte de un mecanismo antiviral de la célula. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que Xrn1 continúa con su actividad degradativa aun cuando existe una relocalización de esta proteína. Sin embargo, hay que recalcar que ya se ha comprobado que la actividad de algunas de las proteínas que componen a los PBs no dependen de su presencia en estas estructuras (Decker *et al.*

2007), por lo que la observación de que Xrn1 pudiera seguir degradando a los RNAs virales no es sorprendente. Por otro lado, es posible que la relocalización de estas proteínas si desregule su función, por lo que es posible que Xrn1 se encuentre degradando mensajeros celulares, esto conllevaría a una disminución de la concentración de mensajeros celulares en el citoplasma y podría ser un medio por el cual el virus favorecería la traducción de sus mensajeros sobre los de la célula. Por otro lado, aun cuando la actividad de Xrn1 depende de la maquinaria de decapping entre las que se encuentra la proteína Dcp1, el silenciamiento de Dcp1 no tuvo un fenotipo equiparable ni en la producción de partículas virales ni en la concentración de RNA viral comparándolo al efecto del silenciamiento de Xrn1. Una posible explicación para los resultados mencionados anteriormente sería que no todo el RNA viral contiene Cap, por lo que este RNA viral sin Cap podría ser un blanco directo de la degradación por Xrn1, lo que explicaría porque la degradación del RNA viral se sigue dando aún en células silenciadas para Dcp1. Sin embargo, si el virus está utilizando la vía de degradación 5'-3' para degradar mensajeros celulares, la deslocalización de esta proteína sí debería ser un factor indispensable. En conclusión, una de las aportaciones más importantes del presente trabajo es la posibilidad del control viral de la degradación de los mRNAs celulares por los mecanismos moleculares descritos anteriormente. Esta vía queda para ser estudiada en trabajos futuros.

GW-Bodies – maquinaria de silenciamiento y rotavirus

Los GW-bodies son estructuras formadas por las proteínas “core” de los PBs clásicos más otras proteínas de la vía del silenciamiento de RNAs como lo son GW182 y Ago2 (Patel *et al.* 2016). Estas estructuras comparten las funciones de degradación de mRNAs y almacenamiento de mRNA, pero también llevan a cabo la regulación de mRNA vía miRNAs. A pesar de compartir ciertas actividades, es importante mencionar que se ha reportado que los GW-bodies y los PBs pueden tener distintas “dinámicas espaciales y temporales” dentro de la célula (Eystathioy *et al.* 2003; Patel *et al.* 2016). En este trabajo observamos que durante la infección de RRV, las proteínas de los GW-bodies responden

de una manera distinta a la de los marcadores de los PBs clásicos, ya que en lugar de disminuir en número, los GW-bodies cambian su distribución espacial en la célula con un aparente aumento en su número. De manera interesante, las proteínas GW182 y Ago2 se relocalizaron hacia los viroplasmatas, aunque se debe resaltar que su distribución dentro de estas estructuras es diferente, ya que GW182 se observó colocalizando con los viroplasmatas teñidos con anti-NSP2, mientras que Ago2 se observa rodeando a los viroplasmatas. Sin embargo, aunque el cambio en la distribución de estas proteínas es distinta de las de los PBs, los experimentos de silenciamiento contra VP3, VP1 y NSP3 mostraron que dicho cambio también correlaciona con la concentración de RNA viral, por lo que la relocalización observada para GW182 y Ago2 parece ser dependiente de la cantidad del mRNA viral.

Al tratar de determinar si la relocalización de las proteínas de los GW-bodies tiene alguna repercusión en la infección viral, observamos que al silenciar a GW182 se ve afectada la infectividad del virus en aproximadamente un 50 %. Aunque esta disminución no se ve reflejada en la progenie ya que no hay cambios en la cantidad de virus infeccioso producido durante la infección. Por otro lado, al silenciar a Ago2 observamos un incremento considerable tanto en la infectividad como en la progenie viral. Finalmente, al preguntarnos si los cambios observados en progenie o infectividad observadas en los silenciamientos de Ago2 y GW182 tienen alguna relación con la concentración del mRNA viral, observamos que al silenciar Ago2 hubo una disminución de aproximadamente un 50 % en la concentración del mensajero viral, mientras que el silenciamiento de GW182 no afectó al nivel del mRNA viral presente en la infección.

Trabajos previos del laboratorio han tratado de describir la distribución espacial de las proteínas dentro del viroplasma (Gonzalez *et al.* 2000). Recientemente el Dr. Garcés, quien ha utilizado la tecnología de súper resolución (artículo sometido), mostró que los viroplasmatas podrían verse como un gránulo formado por varias capas de proteínas, dentro del cual, la proteína NSP2 se encuentra en una de las capas más internas y que una de las capas más externas del viroplasma está compuesto por RNA. Este análisis nos da la idea de que GW182 se encuentra en una de las regiones más internas del viroplasma, quizás

interaccionando con algunas proteínas virales, mientras que Ago2 podría estar interactuando con el RNA viral en una de las capas más externas del viroplasma. Todos estos datos muestran que durante la infección, los rotavirus son capaces de afectar la localización de las proteínas de los GW-bodies. De manera especulativa podríamos pensar que la relocalización tanto de GW182 como de Ago2 a los viroplasma puede deberse a que la concentración de mRNA viral es localmente mayor en estos sitios. Sabemos que en los viroplasma se dan tanto la transcripción de mensajeros como la replicación del genoma viral, por lo que el viroplasma tiene ssRNA viral recién sintetizado así como también se cree que es el sitio con la mayor concentración de dsRNA viral (RNA genómico), lo cual apoyaría a nuestra hipótesis antes mencionada. De ser esto cierto, quedan abiertas muchas preguntas con respecto a qué tipo de RNA viral se está uniendo a Ago2 y si la interacción de esta proteína con su RNA viral blanco depende de siRNAs productos de la infección viral. Otro punto a tratar es si la relocalización de las RBP conlleva a algún beneficio o desventaja para el virus como es el caso de GW182, el cual, a pesar de que se relocaliza al interior de los viroplasma aparentemente no tiene ningún papel durante la infección del virus. Este mecanismo es diferente al observado para la interacción de Ago2 con los mensajeros virales, donde este parece estar evitando la degradación de estos mensajeros, pero a su vez, esta interacción podría también evitar que estos mensajeros se repliquen y/o se empaqueten para formar nuevos virus infecciosos. Esto explicaría por qué a pesar de que hay una disminución en el mRNA viral durante el silenciamiento de la proteína Ago2 hay un incremento en la progenie viral. Por lo que el efecto esponja del RNA viral parece ser un método inespecífico pero efectivo que los rotavirus utilizan para favorecer su ciclo infeccioso.

Finalmente, un punto interesante a tratar es la definición de PB y de GW-Bodies, ya que estas estructuras están catalogadas como uno u otro dependiendo de las proteínas marcadoras que puedas detectar en el gránulo. En el presente trabajo, para el caso de la infección de rotavirus, nosotros solo observamos 4 marcadores (2 de PBs y 2 de GW-Bodies), por lo que no podemos estar seguros de que los gránulos de RNA observados en este trabajo sean realmente PB o GW-Bodies. Sin embargo, si podemos especular que al

menos en el caso de los GW-Bodies, como se mencionó anteriormente, mantienen los marcadores canónicos de un PB y además contienen proteínas del complejo RISC. Los datos obtenidos para estas estructuras muestran que hay un incremento en el número de gránulos marcados con Ago2 y GW182, mientras que los de Dcp1 y Xrn1 disminuyen, por lo que aunque no se realizaron colocalizaciones de estas proteínas, lo más lógico es suponer que los gránulos observados en este trabajo marcados con Ago2 y GW182 realmente no cumplan con la definición de GW-Bodies y que más bien, sean una nueva forma de gránulo de RNA. La caracterización detallada de estos gránulos se abordará en un trabajo futuro.

Conclusiones

Mediante la técnica de MS2-MBP fuimos capaces de determinar que el mRNA mensajero viral se asocia a las proteínas HuR y TIA1.

La infección de rotavirus RRV provoca la relocalización núcleo-citoplasma de HuR, dicha relocalización correlaciona con la concentración de RNA viral.

El silenciamiento de HuR provoca la disminución de la progenie y el mRNA viral

El número de PBs marcados con las proteínas Dcp1 y Xrn1 disminuyen progresivamente durante la infección de rotavirus RRV, y esta disminución depende de la concentración de RNA viral.

El silenciamiento de Dcp1 y Xrn1 provocan un incremento en la progenie viral

El silenciamiento de Xrn1 provoca un incremento en la concentración de mRNA viral

Xrn1 funciona como una proteína antiviral en células infectadas con rotavirus,

Las proteínas GW182 y Ago2 se relocalizan durante la infección de rotavirus hacia el interior o hacia las proximidades de los viroplasmos, y esta relocalización correlaciona con la concentración de mRNA viral.

La proteína Ago2 tiene una función inhibitoria en el proceso de morfogénesis viral.

GW182 no es esencial para la replicación de rotavirus RRV, mientras que Ago2 es importante tanto para el establecimiento de la infección como para la formación de nuevas partículas virales.

Perspectivas

- Los resultados con la proteína HuR apuntan a que podría estar estabilizando a los mensajeros virales permitiendo su traducción, lo que ayudaría a la producción de nuevos viriones.
- La infección con RRV decreta la señal observada de PB marcados con proteínas de la vía de degradación de mRNA en dirección 5'-3', este decremento en la señal es debido a la relocalización de estas proteínas hacia el citoplasma, ¿podría esta relocalización desregular toda esta vía degradativa y provocar la degradación inespecífica de mRNA celular y viral en el citosol?
- Los silenciamientos para Ago 2 incrementan la progenie viral, decreta la concentración de mRNA viral y produce progenie viral más infecciosa por lo que sería interesante demostrar que esta proteína estabiliza a los mensajeros virales pero previene su encapsidación.
- La relocalización de las proteínas Ago2 y GW hacia viroplasma correlaciona con el decremento de la concentración de RNA viral, ¿será que estas proteínas se encuentran en el viroplasma interactuando con el RNA viral? Si es así, ¿interactúan con RNA de doble cadena?, ¿su interacción con el RNA viral depende de siRNAs o miRNAs?
- Aparentemente la concentración de las proteínas Ago2 y GW182 incrementan durante la infección de rotavirus, ¿este incremento es modulado por la infección viral?

Referencias

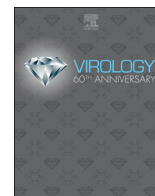
- Aizer, A., Y. Brody, *et al.* (2008). "The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo." *Mol Biol Cell* **19**(10): 4154-4166.
- Arias, C. F., P. Isa, *et al.* (2002). "Molecular biology of rotavirus cell entry." *Arch Med Res* **33**(4): 356-361.
- Arias, C. F., D. Silva-Ayala, *et al.* (2015). "Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits." *J Virol* **89**(2): 890-893.
- Ayala-Breton, C., M. Arias, *et al.* (2009). "Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference." *J Virol* **83**(17): 8819-8831.
- Bagci, S., A. M. Eis-Hubinger, *et al.* (2010). "Clinical characteristics of viral intestinal infection in preterm and term neonates." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**(9): 1079-1084.
- Barnhart, M. D., S. L. Moon, *et al.* (2013). "Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus." *Cell Rep* **5**(4): 909-917.
- Beckham, C. J. and R. Parker (2008). "P bodies, stress granules, and viral life cycles." *Cell Host Microbe* **3**(4): 206-212.
- Bhowmick, R., A. Mukherjee, *et al.* (2015). "Rotavirus disrupts cytoplasmic P bodies during infection." *Virus Res* **210**: 344-354.
- Corcoran, J. A., B. P. Johnston, *et al.* (2015). "Viral activation of MK2-hsp27-p115RhoGEF-RhoA signaling axis causes cytoskeletal rearrangements, p-body disruption and ARE-mRNA stabilization." *PLoS Pathog* **11**(1): e1004597.
- Curry, S., O. Kotik-Kogan, *et al.* (2009). "Getting to the end of RNA: structural analysis of protein recognition of 5' and 3' termini." *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 653-666.
- Chahar, H. S., S. Chen, *et al.* (2013). "P-body components LSM1, GW182, DDX3, DDX6 and XRN1 are recruited to WNV replication sites and positively regulate viral replication." *Virology* **436**(1): 1-7.
- Charley, P. A. and J. Wilusz (2014). "Sponging of cellular proteins by viral RNAs." *Curr Opin Virol* **9**: 14-18.
- Decker, C. J. and R. Parker (2012). "P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(9): a012286.
- Decker, C. J., D. Teixeira, *et al.* (2007). "Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **179**(3): 437-449.
- Doller, A., J. Pfeilschifter, *et al.* (2008). "Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR." *Cell Signal* **20**(12): 2165-2173.
- Dougherty, J. D., W. C. Tsai, *et al.* (2015). "Multiple Poliovirus Proteins Repress Cytoplasmic RNA Granules." *Viruses* **7**(12): 6127-6140.
- Dougherty, J. D., J. P. White, *et al.* (2011). "Poliovirus-mediated disruption of cytoplasmic processing bodies." *J Virol* **85**(1): 64-75.
- Eberhardt, W., A. Doller, *et al.* (2007). "Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach." *Pharmacol Ther* **114**(1): 56-73.
- Emara, M. M. and M. A. Brinton (2007). "Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(21): 9041-9046.
- Estes, M. K. and J. Cohen (1989). "Rotavirus gene structure and function." *Microbiol Rev* **53**(4): 410-449.

- Eystathioy, T., A. Jakymiw, *et al.* (2003). "The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies." *RNA* **9**(10): 1171-1173.
- Franks, T. M. and J. Lykke-Andersen (2008). "The control of mRNA decapping and P-body formation." *Mol Cell* **32**(5): 605-615.
- Gilks, N., N. Kedersha, *et al.* (2004). "Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5383-5398.
- Gonzalez, R. A., R. Espinosa, *et al.* (2000). "Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells." *Arch Virol* **145**(9): 1963-1973.
- Gridley, C. L. and J. T. Patton (2014). "Regulation of rotavirus polymerase activity by inner capsid proteins." *Curr Opin Virol* **9**: 31-38.
- Harvey, R., V. Dezi, *et al.* (2017). "Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins." *Biochem Soc Trans* **45**(4): 1007-1014.
- Jayaram, H., M. K. Estes, *et al.* (2004). "Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication." *Virus Res* **101**(1): 67-81.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, *et al.* (2005). "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling." *J Cell Biol* **169**(6): 871-884.
- Khaperskyy, D. A., T. F. Hatchette, *et al.* (2012). "Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation." *FASEB J* **26**(4): 1629-1639.
- Knipe, D. M. (2006). *Field's Virology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Legros, S., M. Boxus, *et al.* (2011). "The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6." *Oncogene* **30**(38): 4050-4062.
- Lloyd, R. E. (2013). "Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**(3): 317-331.
- Martinez, J. P., G. Perez-Vilaro, *et al.* (2013). "Screening of small molecules affecting mammalian P-body assembly uncovers links with diverse intracellular processes and organelle physiology." *RNA Biol* **10**(11): 1661-1669.
- Maruri-Avidal, L., S. Lopez, *et al.* (2008). "Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles." *J Virol* **82**(11): 5368-5380.
- Matoulkova, E., E. Michalova, *et al.* (2012). "The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells." *RNA Biol* **9**(5): 563-576.
- Mazroui, R., R. Sukarieh, *et al.* (2006). "Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation." *Mol Biol Cell* **17**(10): 4212-4219.
- McClain, B., E. Settembre, *et al.* (2010). "X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution." *J Mol Biol* **397**(2): 587-599.
- Mokas, S., J. R. Mills, *et al.* (2009). "Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition." *Mol Biol Cell* **20**(11): 2673-2683.
- Montero, H., M. Rojas, *et al.* (2008). "Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules." *J Virol* **82**(3): 1496-1504.
- Montero, H. and V. Trujillo-Alonso (2011). "Stress granules in the viral replication cycle." *Viruses* **3**(11): 2328-2338.
- Ohn, T., N. Kedersha, *et al.* (2008). "A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly." *Nat Cell Biol* **10**(10): 1224-1231.
- Panas, M. D., M. Varjak, *et al.* (2012). "Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection." *Mol Biol Cell* **23**(24): 4701-4712.

- Patel, P. H., S. A. Barbee, *et al.* (2016). "GW-Bodies and P-Bodies Constitute Two Separate Pools of Sequestered Non-Translating RNAs." PLoS One **11**(3): e0150291.
- Perez-Vilaro, G., N. Scheller, *et al.* (2012). "Hepatitis C virus infection alters P-body composition but is independent of P-body granules." J Virol **86**(16): 8740-8749.
- Poncet, D., S. Laurent, *et al.* (1994). "Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3." EMBO J **13**(17): 4165-4173.
- Qin, Q., K. Carroll, *et al.* (2011). "Mammalian orthoreovirus escape from host translational shutoff correlates with stress granule disruption and is independent of eIF2alpha phosphorylation and PKR." J Virol **85**(17): 8798-8810.
- Qin, Q., C. Hastings, *et al.* (2009). "Mammalian orthoreovirus particles induce and are recruited into stress granules at early times postinfection." J Virol **83**(21): 11090-11101.
- Rojas, M., C. F. Arias, *et al.* (2010). "Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection." J Virol **84**(20): 10457-10466.
- Ruggieri, A., E. Dazert, *et al.* (2012). "Dynamic oscillation of translation and stress granule formation mark the cellular response to virus infection." Cell Host Microbe **12**(1): 71-85.
- Sheinberger, J. and Y. Shav-Tal (2017). "mRNPs meet stress granules." FEBS Lett **591**(17): 2534-2542.
- Siddiqui, N. and K. L. Borden (2012). "mRNA export and cancer." Wiley Interdiscip Rev RNA **3**(1): 13-25.
- Simone, L. E. and J. D. Keene (2013). "Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons." Curr Opin Genet Dev **23**(1): 35-43.
- Sweet, T. J., B. Boyer, *et al.* (2007). "Microtubule disruption stimulates P-body formation." RNA **13**(4): 493-502.
- Taraporewala, Z. F. and J. T. Patton (2004). "Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae." Virus Res **101**(1): 57-66.
- Tourriere, H., K. Chebli, *et al.* (2003). "The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules." J Cell Biol **160**(6): 823-831.
- Trujillo-Alonso, V., L. Maruri-Avidal, *et al.* (2011). "Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3." J Virol **85**(23): 12594-12604.
- Valiente-Echeverria, F., L. Melnychuk, *et al.* (2014). "eEF2 and Ras-GAP SH3 domain-binding protein (G3BP1) modulate stress granule assembly during HIV-1 infection." Nat Commun **5**: 4819.
- Wilczynska, A., C. Aigueperse, *et al.* (2005). "The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules." J Cell Sci **118**(Pt 5): 981-992.
- Zhou, Z. and R. Reed (2003). "Purification of functional RNA-protein complexes using MS2-MBP." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 27**: Unit 27 23.
- Zhou, Z., J. Sim, *et al.* (2002). "Purification and electron microscopic visualization of functional human spliceosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12203-12207.

ANEXO 1

ARTICULOS PUBLICADOS



Rotavirus RNAs sponge host cell RNA binding proteins and interfere with their subcellular localization

Alfonso Ocegüera, Andrea V. Peralta¹, Gustavo Martínez-Delgado², Carlos F. Arias, Susana López*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Rotavirus
Virus host cell interactions
RNA granules
RNA sponges
RNA binding proteins
P-bodies
GW-bodies

ABSTRACT

Cellular mRNAs cycle between translating and non-translating pools, polysomes compose the translating pool, while RNA granules contain translationally-silenced mRNAs, where the RNAs are either stored in stress granules, or accumulate in processing bodies (PBs) or GW-bodies, which have an important role in RNA degradation. Viruses have developed measures to prevent the deleterious effects of these structures during their replication. Rotavirus, the most common agent of viral gastroenteritis, is capable of establishing a successful infection by counteracting several of the antiviral responses of its host. Here, we describe that in rotavirus-infected cells the distribution of several RNA binding proteins is changed causing the disaggregation of PBs, the relocation of GW-body proteins, and the cytoplasmic accumulation of HuR, a predominantly nuclear protein. We show that this redistribution of proteins is more likely caused by the accumulation of viral RNA in the cytoplasm of infected-cells, where it might be acting as an RBP sponge.

1. Introduction

Rotaviruses are one of the main causes of acute, severe, life-threatening gastroenteritis in children around the world causing an estimate of 220,000 deaths annually, mainly in low-income countries, despite the fact that a successful vaccination program against these viruses began in 2006 (Crawford et al., 2017). This underscores the importance of studies aimed to further characterize the replication cycle of rotavirus looking for ways to control or to decrease its replication.

The rotavirus mature particle is formed by a triple layer of proteins that surrounds the genome formed by 11 segments of double stranded RNA (dsRNA). The inner layer is formed by VP2 and within this layer there are two viral enzymes in very low amounts, VP1 the virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and VP3, the guanylyl-methyltransferase and phosphodiesterase of the virus. The middle layer is formed by VP6, which is surrounded by the outer most layer composed of VP4 and VP7. After entering susceptible cells, the outer layer proteins are released and the double layer capsid becomes transcriptionally active, giving rise to 11 mRNAs that direct the synthesis of the viral proteins and also serve as templates for the synthesis of the genomic dsRNA (Estes, 2013). The transcription activity of the viral particle is

extremely efficient, and in infected cells there can be around 300,000 copies per cell of one of the smallest transcripts (Rubio et al., 2013).

As any other virus, rotaviruses have developed strategies to dodge the antiviral responses of the host cell. These viruses take over the translation machinery of the cell, so that by eight hours post-infection most of the translation apparatus is committed to translate viral mRNAs. Also, during the infection rotavirus prevents the formation of stress granules (SG), which are dynamic cytoplasmic aggregates of stalled preinitiation complexes that are formed during different types of cell-stress and that arrest the translation of most mRNAs (Rubio et al., 2013). SGs form part of a growing group of RNA granules, aggregates of different RNAs and proteins that have been recently characterized (Tsai and Lloyd, 2014). Processing bodies, or PBs, are the second largest group of cytoplasmic aggregates; in contrast with SGs, these structures are constitutively present in the cell cytoplasm and are enriched in components of the 5'-3' mRNA decay machinery, including deadenylases, decapping enzymes, and exonucleases, and thus PBs are thought to be places where RNA is degraded. GW182 bodies (GW-bodies) represent another group of recently described RNA granules that in addition to the proteins found in PBs, also contain a group of RNA binding proteins (RBPs) involved in nonsense-mediated decay and

* Correspondence to: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.

E-mail address: susana@ibt.unam.mx (S. López).

¹ Present address: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB Buenos Aires, Argentina.

² Present address: Instituto Cumbres Lomas, Mexico City, Mexico.

microRNA-mediated silencing, such as GW182 and Ago proteins. It has been recently proposed that PBs and GW-bodies represent two separate pools of sequestered non-translating mRNAs (Patel et al., 2016).

It has been reported that, in addition to preventing the formation of SGs, in rotavirus-infected cells the formation of SGs is inhibited even when cells are induced to form these structures by treatment with arsenite, a classic SG inducer (Montero et al., 2008); however, the mechanism by which the formation of SGs is prevented during the infection has not been determined. More recently, Bhowmick et al. (Bhowmick et al., 2015) found that different rotavirus strains were able to inhibit, or decrease, the formation of PBs during the infection. They reported that the deadenylating Pan3 enzyme was sent to degradation, while the exonuclease Xrn1 and the decapping enzyme Dcp1 were re-localized from the cytoplasm to the nucleus, and it was also shown that these three PB-components were able to interact, directly or indirectly, with viral RNA (Bhowmick et al., 2015). The molecular mechanisms by which these proteins were re-localized to the nucleus were not established.

The distribution of mRNAs between polysomes, SGs, and PBs in a given cell condition determines the rate of mRNA translation and degradation, thus directly influencing gene expression (Anderson and Kedersha, 2008). When an mRNA is targeted for degradation in the cytoplasm, its polyA tail is initially removed, and then it is subjected to exonucleolytic degradation either in the 3' to 5' direction by the exosome, or it is marked by the LSM1–7 complex for decapping by Dcp1/2, and degraded by Xrn1 in the 5' to 3' direction. Many of the cellular proteins involved in these processes are aggregated in PBs or in GW-bodies (reviewed in Moon and Wilusz (2013)). Since RNA granules have fundamental roles in the fate of cellular and viral mRNAs, several viruses have developed measures to prevent the deleterious effect of these structures during their replicative cycles (reviewed in Tsai and Lloyd (2014)). Here, we decided to determine whether rotaviruses have developed a strategy to prevent the antiviral effects of the RNA granules. We found that during rotavirus infection the distribution of several RBPs is changed, causing the disaggregation of PBs, the relocalization of proteins constituent of GW-bodies, and the cytoplasmic accumulation of HuR, an RBP that is predominantly nuclear. We also demonstrate that the redistribution of host cell proteins is more likely caused by the accumulation of viral RNA in the cytoplasm of infected cells, where it might be acting as a sponge for several host RNA binding proteins.

2. Results

2.1. Rotavirus infection decreases the amount of Dcp1- and Xrn1-stained PBs

To determine if there was an alteration in the distribution or amount of PBs during rotavirus infection, we compared by immunofluorescence the presence of these RNA granules in mock-infected or rotavirus-infected cells, using antibodies against two of the most common PBs markers: Dcp1 and Xrn1; as a marker of infection, we used antibodies against rotavirus NSP2, which is a non-structural protein that forms part of the viroplasm (Fig. 1). We found that there was a nice, even distribution of small puncta characteristic of PBs when mock-infected MA104 cells were stained with antibodies to Dcp1 or to Xrn1. This distribution changed in cells that were infected with rotavirus, where there was an apparent decrease in the number of PBs. To analyze quantitatively the change in the number of PBs stained by Dcp1 and Xrn1 antibodies, we determined the number of PBs per cell present at different times post-infection. Fig. 1B shows that the number of PBs decreased as the infection proceeded reaching a decrease of 77% and 74% for Dcp1 and Xrn1, respectively, at 8hpi. To determine if the reduction in the number of PBs observed in rotavirus-infected cells was due to a reduction in the amount of Xrn1 and Dcp1 proteins, or to a redistribution of these proteins in the cell, we quantitated the amount of Xrn1 and Dcp1 proteins present in cells at different times post-infection

and compared them with mock-infected cells by western blot assays, using specific antibodies against these two proteins (Fig. 1C). We found that there were no significant changes in the levels of Dcp1 and Xrn1, indicating that the reduction in the number of PBs observed is not due to a decrease in the amount of these proteins but more likely to a redistribution of these proteins caused by the infection.

2.2. The number of PBs present in infected cells is affected by the amount of viral RNA

Since the amount of Dcp1 and Xrn1 proteins did not change in the course of rotavirus infection, but the number of PBs decreased, it was possible that these PB proteins were no longer aggregated in RNA granules, but homogeneously dispersed in the cell cytoplasm. We have established that during rotavirus infection the amount of viral transcripts is very high (at 8 hpi there are about 300,000 copies of the NSP4 transcript per cell) (Rubio et al., 2013), thus we reasoned that a plausible explanation for the disaggregation of PBs could be that during the infection, some of the proteins that formed part of these RNA granules became associated with viral RNAs. To test this idea, we silenced the expression of VP1 (the viral RdRp) or VP3 (the guanylyl-methyl transferase) in rotavirus-infected cells and looked for the number of PBs present in these cells. We have previously reported that silencing the expression of these two viral genes by RNA interference resulted in a decrease of about 90% of the viral mRNAs and genomic dsRNA, while the synthesis of the viral proteins was not affected (Ayala-Breton et al., 2009). As a control, we also silenced the expression of NSP3, which results in an increase of viral mRNA and dsRNA levels of about three times (Montero et al., 2006). The level of silencing of each of the viral proteins was tested by western blot using specific antibodies (Fig. 2A), the effect on viral RNA synthesis was determined by quantitative RT-PCR assay (Ayala-Breton et al., 2009) (Fig. 2B), and the number of PBs stained with antibodies to Xrn1 or Dcp1 was counted in siRNA-treated cells that had been infected or not with rotavirus (Fig. 2C and D). We found that, while in cells transfected with an irrelevant siRNA the number of Dcp1- and Xrn1-stained PBs represented about 30% the number of PBs observed in mock-infected cells, when either VP1 or VP3 were silenced the number of these RNA granules increased twice or more (Figs. 2C and 2D); accordingly, the amount of viral RNA detected was reduced by 80–90% that of the control transfected cells (Fig. 2B). Interestingly, when NSP3 was silenced and the amount of viral RNA increased in the cytoplasm, the number of PBs was equal or slightly less to that obtained in control cells treated with the control siRNA. Together, these results suggest that the amount of viral RNA present in the cytoplasm of infected cells affects the aggregation of Dcp1 and Xrn1 into RNA granules, and might explain the reduction in the number of PBs observed in infected cells.

2.3. GW182 and Argonaute 2 change their localization during rotavirus infection

As previously mentioned, it has been shown that besides PBs, a different kind of RNA granules named GW-bodies could be present in the cell's cytoplasm (Patel et al., 2016). To determine if GW-bodies were present in MA104 cells and if their distribution and/or number were also altered during rotavirus infection, we looked for these structures by immunofluorescence using antibodies to GW182 and to Argonaute 2 (Ago2) protein, which is a component of the RISC machinery and has been found in SGs, PBs, and GW-bodies (Poblete-Duran et al., 2016) (Fig. 3). In this case, we found that in mock infected cells the distribution of both proteins was in a punctuated pattern throughout the cytoplasm; the signal observed with the antibody to GW182 was similar to that observed with Dcp1 and Xrn1 antibodies, in which a discrete amount of small granules in each cell could be observed. In contrast, with the antibody to Ago2 we observed an increased number of small foci, which might represent the different RNA granules

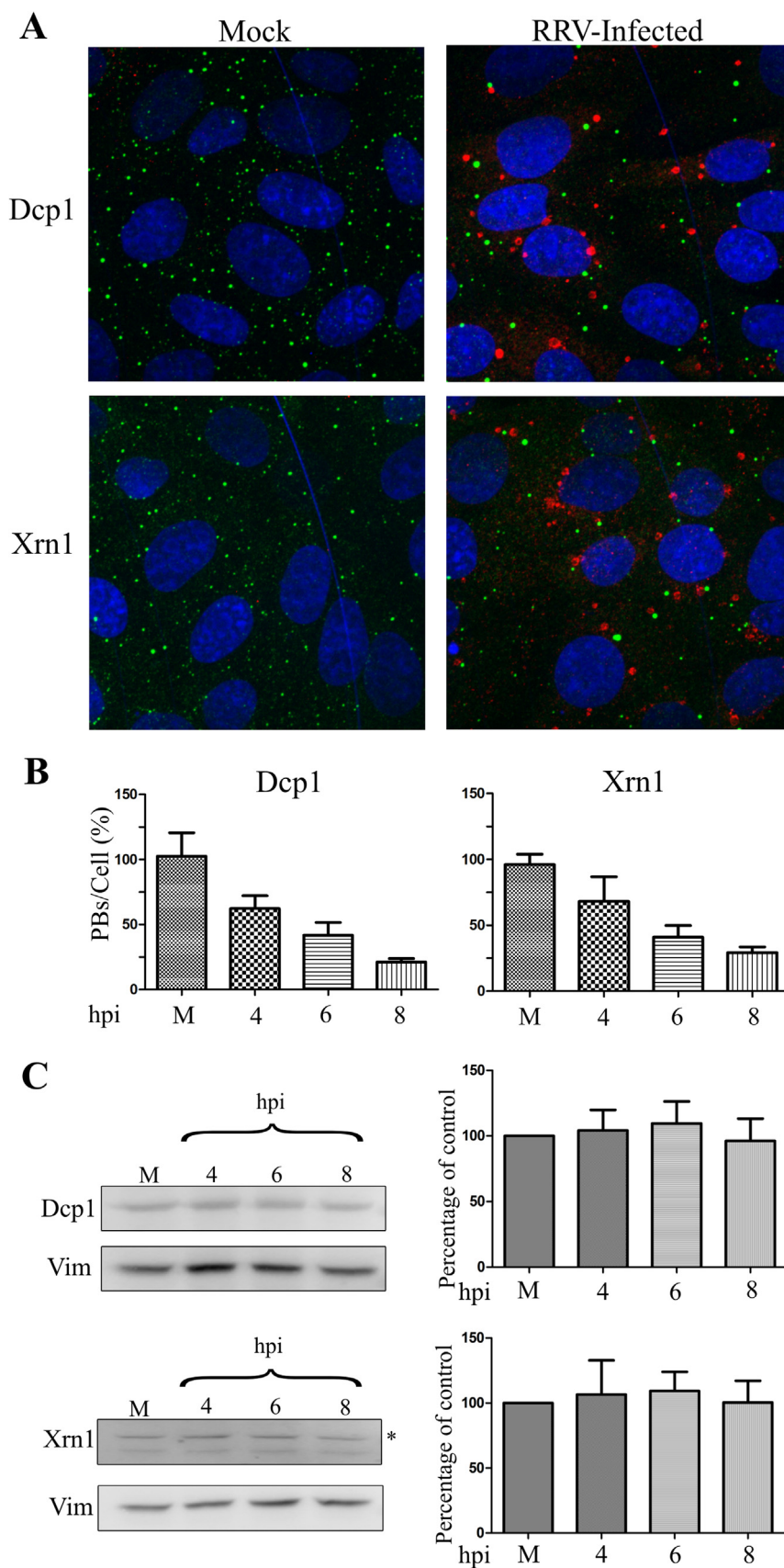


Fig. 1. The amount of PBs decreases during rotavirus infection. A) Confluent MA104 cells grown in coverslips were mock-infected or infected with RRV at an MOI of 5, and 8 hpi cells were fixed and stained with antibodies against Dcp1, or Xrn1 (green), or to NSP2 (red) as indicated under Section 4. The cell nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; in blue). B) Confluent MA104 cells grown in coverslips were mock-infected or infected with RRV at an MOI of 5, and at the indicated times post infection (hpi), cells were fixed and stained as indicated in A) and the number of PBs was counted by a macro made from image J applications for image analysis. Data shown were obtained by counting 300 cells in each condition. Values are expressed as the percentage of the number of PBs counted in uninfected cells which were, on average, 12 PBs/cell. The arithmetic mean \pm SEM of three independent experiments is shown. D) MA104 cells were mock-infected or infected with RRV at an MOI of 5 and at the indicated times cells were lysed and the proteins were resolved in an SDS-10% PAGE, transferred to nitrocellulose and Dcp1 or Xrn1 were detected by immunoblot analysis with the indicated antibodies. Left, representative western blots stained with anti-Dcp1 or anti-Xrn1. Vimentin (Vim) was used as a loading control; the asterisk indicates the band that corresponds to Xrn1. Right, quantitation of the amount of protein detected under each condition. The relative amount of the indicated protein was calculated by densitometry of the bands using ImageQuant TL software (Amersham, Biosciences). Values represent the amount of protein detected as a percentage of the amount of protein detected in mock-infected cells normalized with its corresponding loading control (Vim). The arithmetic mean \pm SEM of three independent experiments is shown.

to which this protein is associated. In rotavirus-infected cells we found that the localization of these two proteins behaved differently, in the case of GW182, the number of GW-bodies increased, and apparently a

portion of this protein co-localized with viroplasm, while in the case of Ago2 most of the puncta stained with the antibody became perinuclear and appear to accumulate around viroplasm (Fig. 3). These

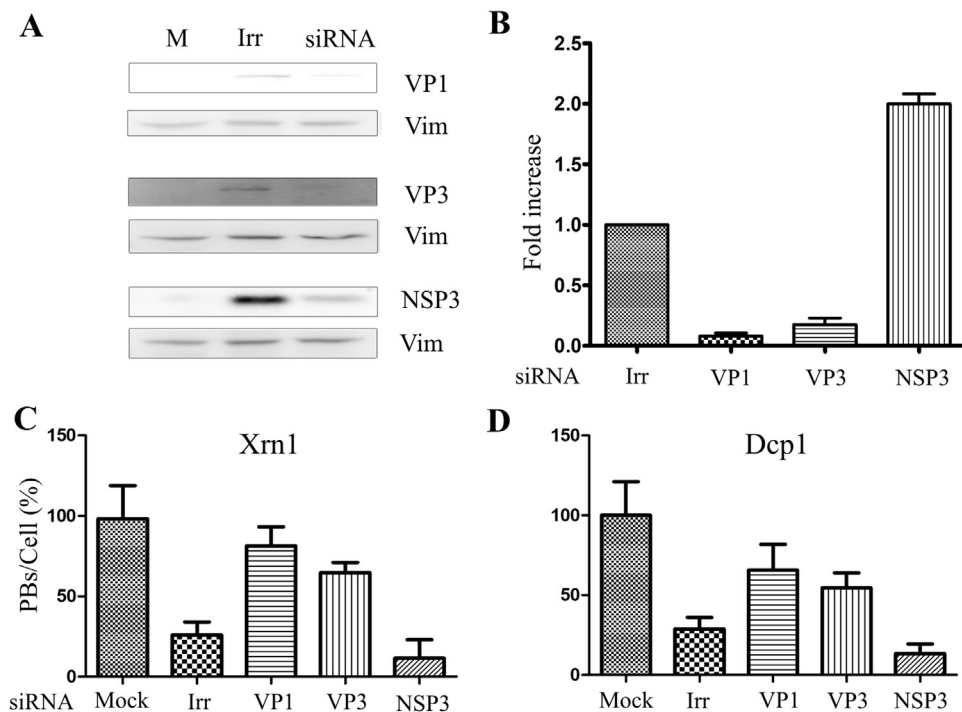


Fig. 2. The level of viral RNA affects the number PBs. A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs, 72 h post-transfection cells were infected with RRV at an MOI of 5. Eight hpi cells were lysed and the proteins were resolved in an SDS-10% PAGE, transferred to nitrocellulose and VP1, VP2, or NSP3, were detected by immunoblot analysis using the indicated antibodies, or Vimentin (Vim) as loading control. B) Cell lysates were extracted with Trizol and the RNA of gene segment 10 of rotavirus, and the 18S rRNA were quantitated by RT-qPCR as indicated under Materials and Methods. The results were normalized to the levels of 18S rRNA detected in each sample. The RT-qPCR results are expressed as fold increase relative to the amount of gene 10 RNA detected in cells that were transfected with the irrelevant siRNA (Irr), which was taken as 1. The arithmetic mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate is shown. C) and D) In parallel wells, MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs, 72 h hours post-transfection cells were infected with RRV at an MOI of 5, and 8 hpi cells were fixed and stained with antibodies against Xrn1 (C), or Dcp1 (D), and the number of PBs was counted as indicated in Fig. 1. Data shown were obtained

from counting 300 nuclei in each condition. Values are expressed as percentage of the number of PBs counted in uninfected nuclei (M), which were on average 12 PBs/nuclei. The arithmetic mean \pm SEM of three independent experiments is shown.

observations suggest that the PBs stained with Dcp1 and Xrn1 antibodies are different from the granules stained with GW182 and Ago2.

To establish whether the relocalization observed for GW182 and Ago2 proteins was also driven by the amount of viral RNA present in the cytoplasm of infected cells, we used the same strategy described above to reduce the amount of viral RNA in the infection by silencing the expression of either VP1 or VP3, and looked for the distribution of

these proteins in silenced and infected cells by immunofluorescence microscopy (Fig. 4). Rotavirus-infected cells treated with an irrelevant siRNA showed the same distribution of GW182 and Ago2 proteins as that observed in the infected cells that were not treated with siRNAs; however, when either VP1 or VP3 were silenced, the distribution of these two proteins changed; GW182 no longer colocalized with viroplasm, and its distribution appeared almost identical to that observed

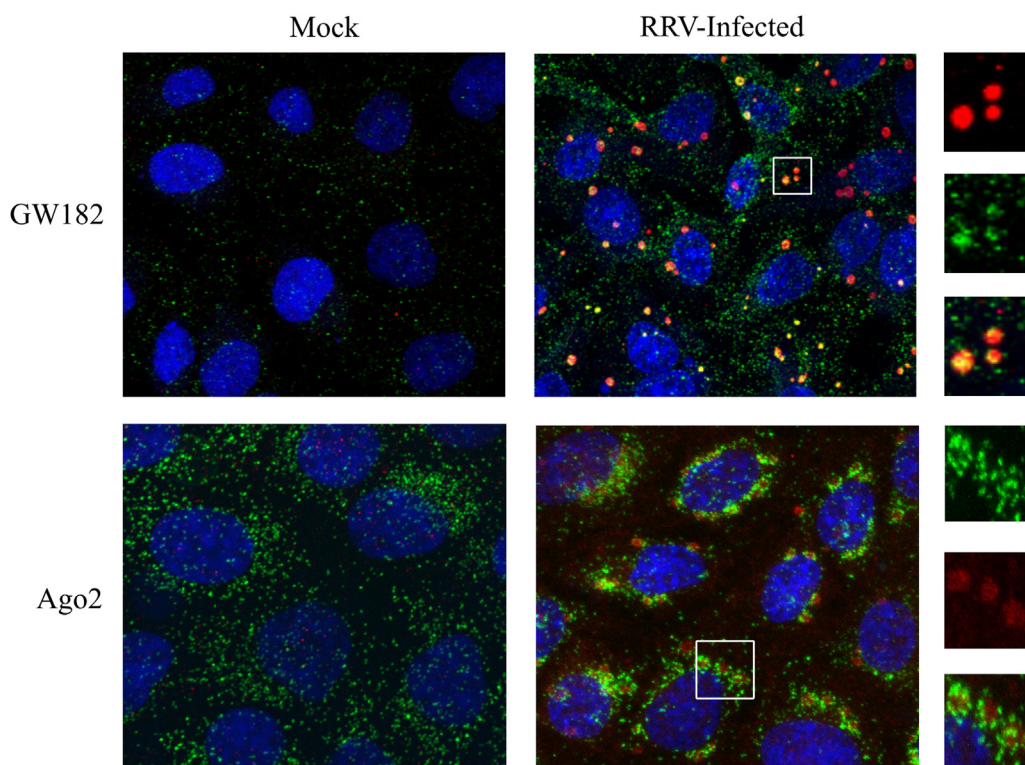


Fig. 3. GW182 and Argonaute 2 change their distribution in rotavirus-infected cells. Confluent MA104 cells grown in coverslips were mock-infected or infected with RRV at an MOI of 5, and at 8 hpi cells were fixed and stained with antibodies against GW182, or Ago2 (green), and to NSP2 (red); cell nuclei were stained with DAPI (blue) as indicated under Section 4. The images for GW182 staining were acquired in an Olympus confocal Fluoview 1000 multifotonic microscope, and for Ago2 staining a 3I Marianas spinning disk confocal microscope was used.

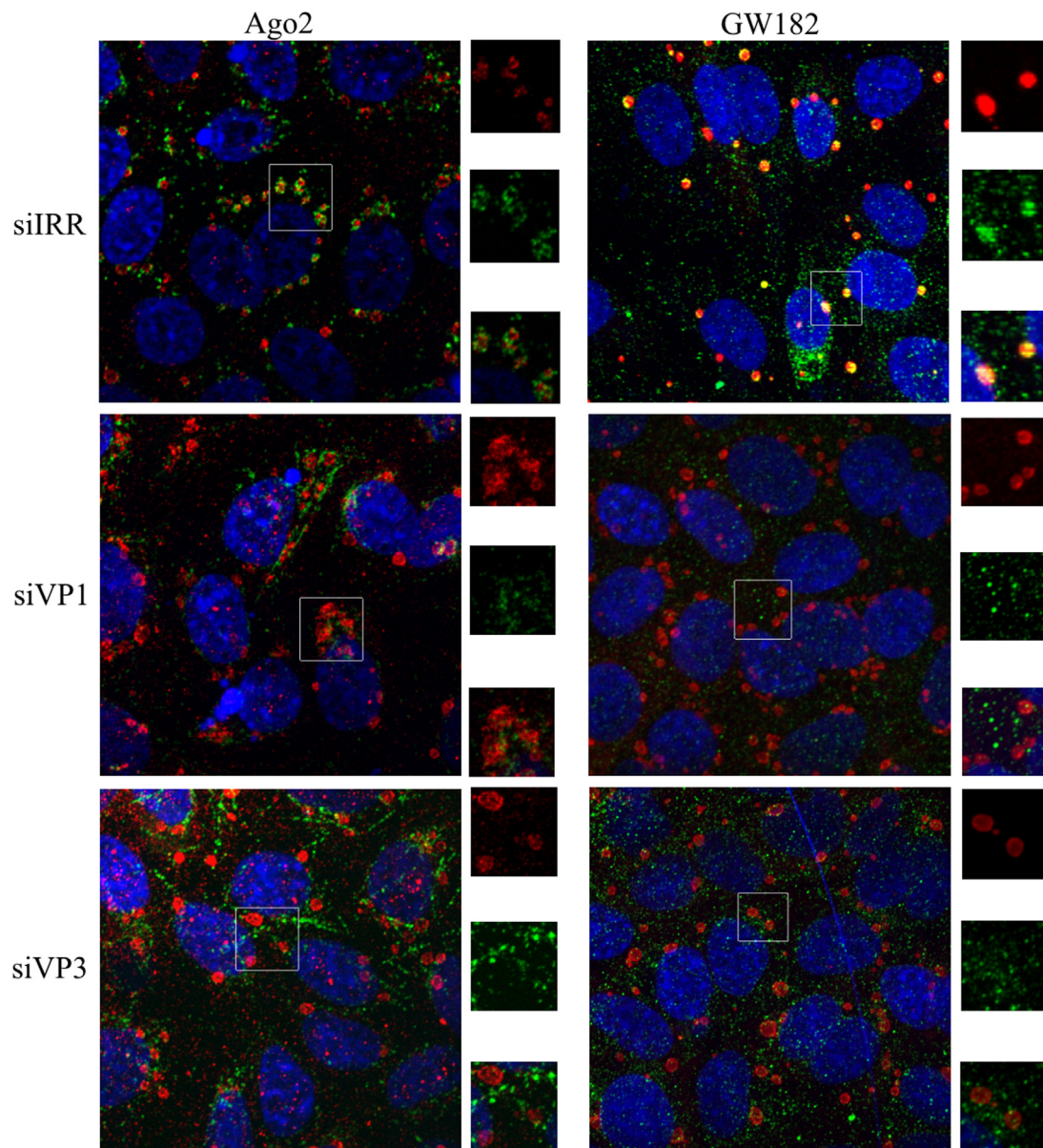


Fig. 4. The distribution of GW182 and Ago2 during rotavirus infection depends on the amount of viral RNA. MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs; seventy-two hours post-transfection cells were infected with RRV at an MOI of 5, and at 8 hpi cells were fixed and stained with antibodies against GW182, or Ago2 (green), and to NSP2 (red) as indicated under Section 4. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). The images were acquired in a 3I Marianas spinning disk confocal microscope. Representative colocalization images of NSP2 with Ago 2 and GW182 are shown. Manders' correlation coefficients ($M \pm SE$), were obtained analyzing 12 cells per condition as indicated under Materials and Methods, and are as follows: Ago2-siIrr ($M = 0.84 \pm 0.20$), Ago2-siVP1 ($M = 0.42 \pm 0.22$), Ago2-siVP3 ($M = 0.28 \pm 0.05$), Gw182-siIrr ($M = 0.84 \pm 0.20$), Gw182-siVP1 ($M = 0.28 \pm 0.02$), Gw182-siVP3 ($M = 0.26 \pm 0.10$), where M represents the percentage of NSP2 pixels (red) that overlap with GW182 or Ago2 pixels (green) (where $M = 0$ represent no colocalization and $M = 1$ represent 100% of colocalization).

in mock-infected cells, in which a discrete number of foci could be seen. A similar situation was observed in the case of Ago2, where the signal that appeared surrounding the viroplasm was not longer present in VP1- or VP3-silenced cells, and some of it appeared to be localized in fibers. These results suggest that the cellular distribution of these two proteins also depends on the concentration of viral RNA present in the cytoplasm of infected cells.

2.4. The cellular localization of HuR protein is also altered in rotavirus infected cells

Since our results suggested that several proteins that form part of RNA granules changed their localization in rotavirus-infected cells, we

wanted to study if the cellular distribution of another RBP that does not typically form part of RNA granules was also altered due to infection. HuR is an RNA binding protein that is predominantly nuclear, but shuttles between the nucleus and the cytoplasm, and is known to influence the stability and translation of several cellular mRNAs (Abdelmohsen and Gorospe, 2010). We compared the localization of the HuR protein between mock-infected and infected cells by immunofluorescence microscopy. We found that while this protein is mostly present in the nucleus of mock-infected cells, it appears to accumulate in the cytoplasm of the cells infected with rotavirus (Fig. 5). Interestingly, when the amount of viral RNA was decreased in the cytoplasm, by silencing the expression of VP1, the nuclear localization of HuR was restored (Fig. 5). Taken together, these results suggest that

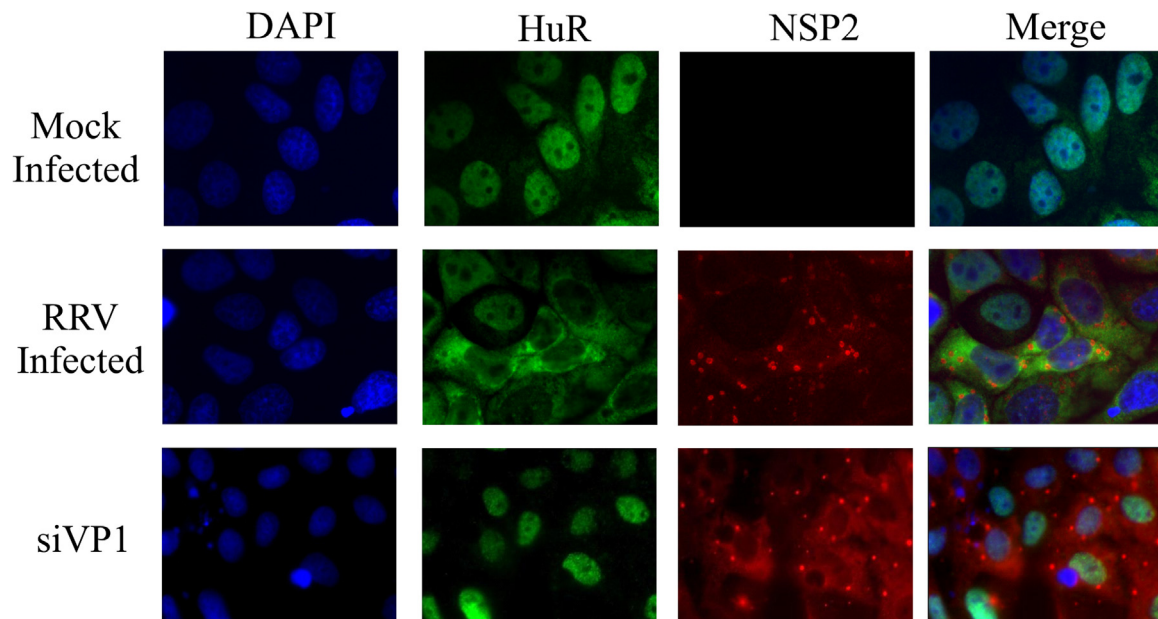


Fig. 5. The subcellular localization of HuR changes during rotavirus infection. MA104 cells grown in coverslips were either transfected with an siRNA to VP1 or mock-transfected and 72 h post-transfection cells were infected or not with RRV at an MOI of 5. Eight hpi cells were fixed and stained with antibodies against HuR (green), and to NSP2 (red), as indicated under Section 4. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). The images were acquired in a Zeiss “Axioskop 2 mot plus” epifluorescence microscope.

during rotavirus infection, the amount of viral RNAs present in the cytoplasm seem to be modifying the distribution of several RBPs, preventing their usual cellular localization and probably their function.

2.5. Viral RNA binds to Xrn1, Dcp1, Ago2 and Hur in rotavirus-infected cells

To demonstrate a direct interaction between viral RNA and the proteins studied in this work we performed immunoprecipitation (IPP) assays of rotavirus-infected cell lysates, using mAbs directed to Ago2, Xrn1, Dcp1 or HuR (the antibody against GW418 was not appropriate for IPP assays). As controls we used a mouse pre-immune antibody and two mAbs against cellular proteins, the heat shock protein 70 or to protein phosphatase 1 (PP1), with no known RNA binding properties. The resulting IPPs were analyzed either by Western blot with the homologous antibodies to verify the immunoprecipitation (Fig. 6A), or were extracted with Trizol, and the presence of viral RNA was determined by end-point RT-PCR, using oligonucleotides that specifically amplify segment 10 mRNA (that encodes rotavirus NSP4) (Fig. 6B). We detected the presence of viral RNA segment 10 in the lysates that were immunoprecipitated with antibodies to Xrn1, Dcp1, Ago2, and HuR, but no viral RNA was detected when the lysates were immunoprecipitated with the control pre-immune mice antiserum or with the two control antibodies (anti-Hsp70 or anti-PP1). These results demonstrate that viral RNA interacts with the RBPs characterized in this work since it co-precipitated with antibodies against these proteins, and supports the idea that viral mRNA might be sponging cellular RBPs during the infection.

2.6. Role of the characterized RBPs during rotavirus infection

Since the cellular distribution of Xrn1, Dcp1, GW182, Ago2, and HuR was altered during rotavirus infection, we wonder whether these proteins had an anti-rotaviral activity and, thus, their trapping by viral RNA could be considered as a counter-measure to prevent their inhibitory function. To characterize the role of these proteins in the rotaviral cycle, we silenced their expression by RNAi and determined the amount of viral RNA that was made during the infection; we also

quantitated the amount of mature infectious virus produced in the silenced cells. The effectiveness of each silencing was verified by western blot (Fig. 7A), and the effect of knocking down each of these proteins on the synthesis of viral RNA was determined by RT-qPCR, measuring the amount of the segment 10 mRNA. We found that when the expression of Dcp1 or GW182 was silenced, there was no change in the amount of viral RNA synthesized at 8 hpi, as compared to the amount synthesized in cells treated with an irrelevant siRNA. In contrast, when Ago2 and HuR were silenced, there was a decrease in the amount of NSP4 mRNA of about 50%. Interestingly, knocking down the expression of Xrn1 resulted in a two-fold increase in RNA synthesis, suggesting that even though the presence of this RNase is reduced in PBs, it is still active degrading RNA (Fig. 7B), as has been previously reported (Decker et al., 2007). The effect of silencing these proteins on the replication cycle of rotavirus was measured by quantitating the amount of infectious virus produced in the absence of each RNA binding protein. Compared to the amount of virus produced in cells that were transfected with an irrelevant siRNA, we found that, as expected, when Xrn1 was silenced the amount of viral progeny increased about 4-fold. Silencing Dcp1 caused a two-fold increase, while knocking down the expression of GW182 did not affect the amount of infectious virus produced. When HuR was silenced, a reduction of about 50% in virus production was observed, in accordance to the reduction in viral RNA (Figs. 7B and 7C).

In contrast to these results, we found that when Ago2 was silenced there was a four-fold increase in viral progeny, while the amount of viral RNA detected under these conditions was decreased by 50% compared to the control transfected cells, suggesting that the viral RNA present in these cells might be more efficiently encapsidated. To test this idea, viral particles obtained from infected cells in which Ago2 was silenced, were partially purified by extracting the infected cell lysate with Freon and pelleting the viral particles through a 40% sucrose cushion. The amount of protein in the pellets was quantitated, and their infectivity was determined. In two independent experiments, we found that there were two times more infectious viral particles per μg of protein in cells in which Ago 2 was silenced compared to the particles obtained from cells treated with an irrelevant siRNA (Fig. 7D), suggesting that even though there was less viral RNA in Ago2 knocked down cells (Fig. 7B), it might be more efficiently encapsidated.

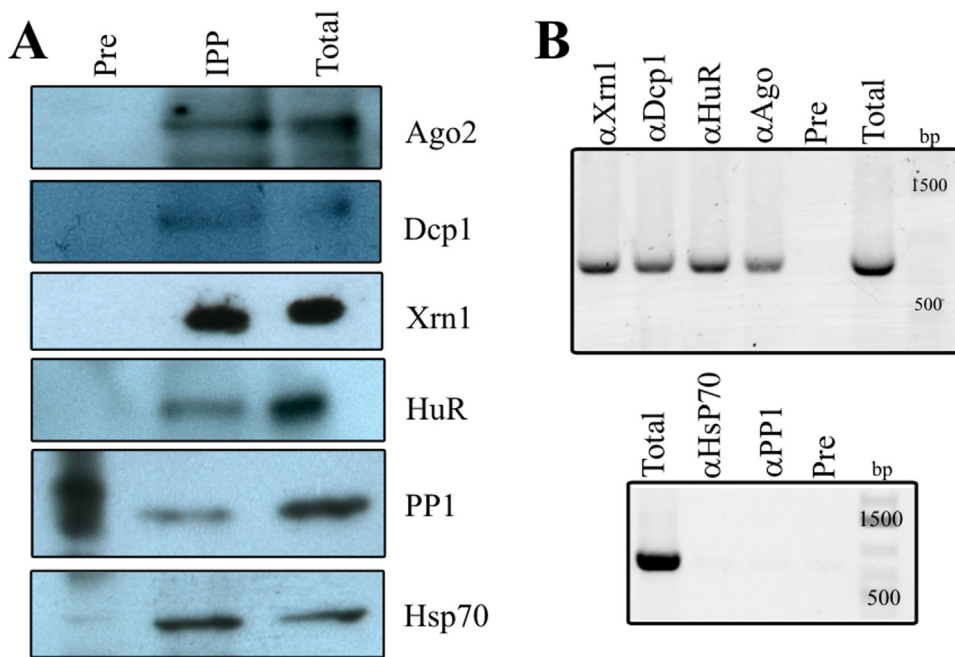


Fig. 6. Viral RNA binds to Xrn1, Dcp1, Ago2 and HuR in rotavirus-infected cells. Confluent MA104 cells grown in 150 mm² flasks were infected with RRV at an MOI of 5, and 8 hpi cells were sonicated and the cell lysate was immunoprecipitated (IPP) with the indicated mAbs, or with a mouse pre-immune serum (Pre) as a control. A) The immunoprecipitates or a non-immunoprecipitated lysate (Total), were resolved in an SDS-10% PAGE, transferred to nitrocellulose and the indicated RBPs were detected by immunoblot analysis using the corresponding antibodies, or B) The RNA present in the IPPs or in a total lysate were extracted with Trizol, and RNA gene segment 10 of rotavirus was amplified by RT-PCR, and the products were resolved in 0.8% agarose gels as indicated under Materials and Methods.

3. Discussion

In this work, we have found that during rotavirus infection several RBPs change their distribution in the cell. The PBs present in the cytoplasm of infected cells, when stained with antibodies against two typical markers of these RNA granules, Xrn1 and Dcp1, appear to decrease in number, while the total amount of these two proteins does not change significantly. Looking for the distribution of GW182 and Ago2 proteins, which are known to be present in different RNA granules, we also found that their distribution was altered in the infected cells. A portion of GW182 seem to colocalize with viroplasm, while Ago2 was observed surrounding these viral structures. Furthermore, when the localization of an RBP that does not typically aggregates in RNA granules, HuR, was characterized, we found that it also changed its localization in infected cells, from being present mainly in the cell nucleus, to re-localize to the cell cytoplasm.

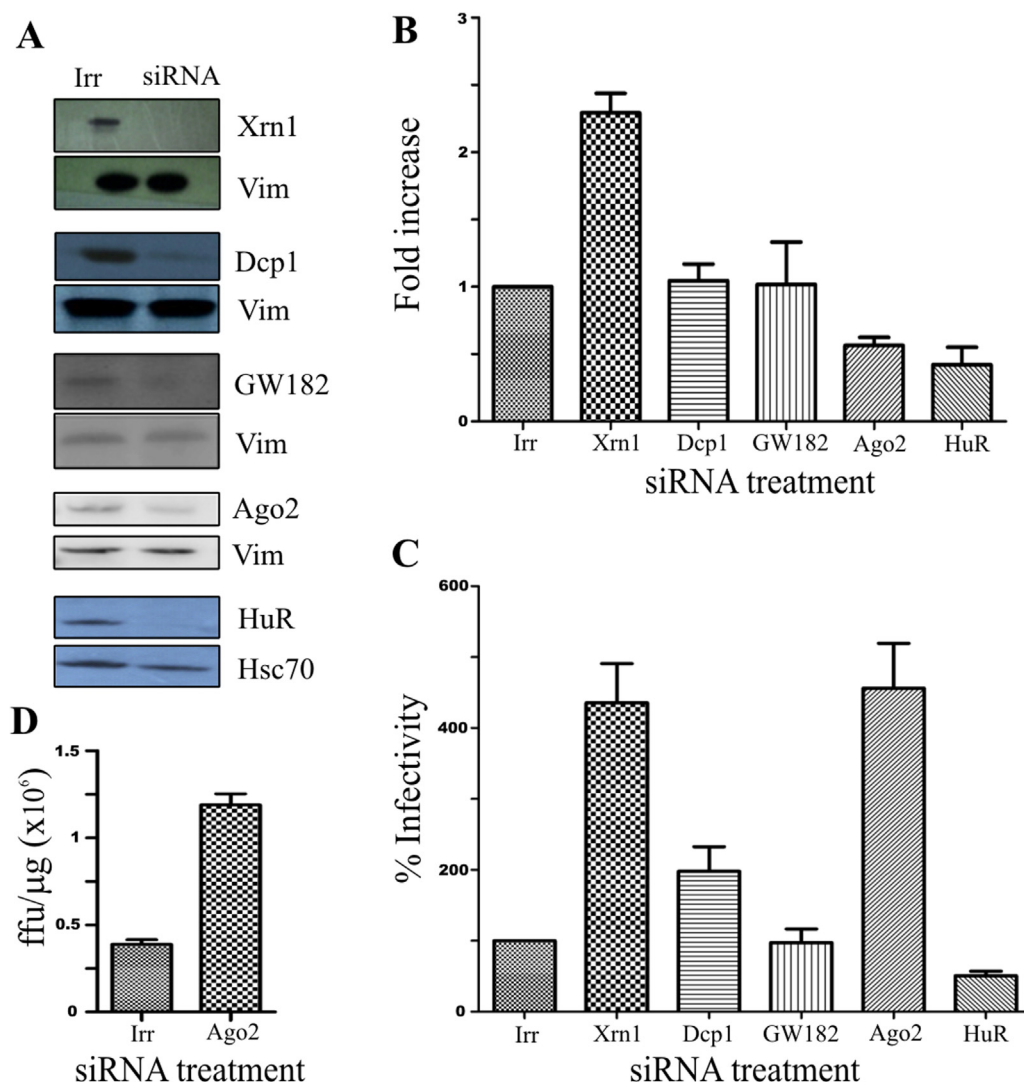
Interestingly all the changes in the subcellular localization of these proteins, could be reversed when the amount of viral RNA in rotavirus infected cells was reduced to about 10% the amount in control cells, through silencing the expression of either VP1, the viral RNA-polymerase, or VP3, a viral protein that besides having a methyl-guanlyl transferase activity, contains a phosphodiesterase domain that cleaves the 2'-5' oligoadenylates, preventing the activation of RNase L (Sanchez-Tacuba et al., 2015). These observations suggest that the viral RNA could be interacting with the proteins characterized here, causing their re-localization.

Apparently, not all the interactions between the rotavirus transcripts and the cellular proteins are equal. In the case of the PBs proteins characterized here, their aggregation in RNA granules is clearly prevented. Bhowmick et al. (2015) made similar findings when characterizing the behavior of PBs in rotavirus infected cells, however, they found that Xrn1 and Dcp1 were relocalized to the nuclei of infected cells, as opposed to our findings that these proteins were no longer present in PBs, but rather were homogeneously dispersed in the cell cytoplasm. It is not easy to explain these different observations, however, we think that most of the differences noted between Bhowmick et al. and our work could be due to two main reasons. One is that the rotavirus strain that was mainly used in their work was the simian rotavirus strain SA11, which is different from the rhesus strain RRV we used in this work. Several different phenotypes have been noted when

these two different rotavirus strains have been compared. For example, RRV and SA11 differ in their entry mechanism; while SA11 depends on clathrin-mediated endocytosis, RRV entry is clathrin- and caveolin-independent (Diaz-Salinas et al., 2014). Also, it was reported that the severity of disease and spread of rotavirus infection in mice differs depending on the virus strain used for inoculation, in this model RRV and SA11 showed different phenotypes (Ciarlet et al., 2002). The second, and most likely reason, could be that in the immunofluorescence assays shown in Bhowmick et al., the cells were treated with sodium arsenite, a well-known cellular stress inducer, and indeed it has been observed that this treatment could cause nuclear translocation of cytoplasmic proteins (see for example: (Garcia-Yague et al., 2013)). In our hands, during RRV infection we were not able to observe any nuclear translocation of Xrn1 or Dcp1. On the other hand, silencing the expression of these two proteins in rotavirus-infected cells had different phenotypes. While there was not a significant change in viral RNA or viral progeny produced in the absence of Dcp1, when Xrn1 was silenced both the amount of viral RNA transcripts and the infectious virus particles increased up to four-fold (in the case of viral progeny), suggesting that the activity of this cellular RNase is deleterious for viral transcripts, and that even though during the infection is no longer present in PBs, it is still active.

In the case of GW-bodies, we found that during infection, a portion of GW182 clearly colocalized in viroplasm, however, the fact that knocking down the expression of this protein did not have a significant effect on the replication of rotavirus suggests that this interaction is not relevant for virus infection. In contrast, the interaction of Ago2 with viral RNA seem to have an impact during infection. A portion of this protein appeared surrounding the viroplasm, most probably interacting with the recently synthesized transcripts. When Ago2 was silenced, the amount of viral RNA decreased, but the total amount of infectious viral particles increased four-fold suggesting that the interaction of Ago2 with viral RNA might prevent its degradation, but also might be hampering its encapsidation into virions; indeed, we found that there were more infectious viral particles formed in Ago2 silenced cells (Fig. 7D); further experiments are needed to identify the mechanism by which Ago2 might be interfering with the encapsidation process.

We have previously shown that during the infection there is an enormous accumulation of viral RNA in the cytoplasm of infected cells;



duplicate are shown. D) Viral particles were semi-purified from rotavirus infected cell lysates that were transfected with an siRNA to Ago 2, or with siIRR, and their concentration and infectivity was determined as indicated under Materials and Methods. Data are expressed as focus forming units (ffu)/μg of protein. The arithmetic means \pm standard deviation of two independent experiments performed in duplicate are shown.

by RT-qPCR we estimated that there are about 300,000 copies per cell of the RNA segment 10, and about 100,000 copies per cell of RNA segment 6 (Rubio et al., 2013). Considering that the rotavirus genome contains 11 RNA segments, a moderate calculation, thinking that there are about 100,000 copies of each segment, would give a rough estimate of 1.1×10^6 copies of viral mRNAs/cell, only about three times less than the amount of 18S rRNA per cell! Thus, it is highly likely that the amount of viral RNA present in the cell cytoplasm could sponge many of the RBPs of the cell changing their distribution and also altering their functions. The fact that decreasing 90% the amount of viral RNA present in the infected cells almost completely reverts the localization of these RBPs, suggests that this is the case. Indeed, viral mRNAs interact with Dcp1, Xrn1, Ago2, and HuR in rotavirus infected cells, since we found that viral RNA coprecipitated with these RBPs when immunoprecipitated with specific antibodies.

In general, the accumulation of large amounts of viral RNA in viral infections is not that uncommon and might be seen as a rudimentary measure used by viruses to ensure the efficient replication of their genome and the effective translation of their mRNAs to guarantee a successful infection. There is an increasing number of examples of viruses in which the accumulation of viral RNA in the cell's cytoplasm functions as a protein sponge, hijacking cellular RBPs proteins (Charley

and Wilusz, 2014), with dengue virus and Sindbis virus being two well-known examples. In dengue virus infection, an accumulation of the small non-coding sRNA takes place, the sRNAs bind and down-regulate the activity of G3BP1, G3BP2, and CAPRIN1, inhibiting the response modulated by interferon β (IFN- β) (Bidet et al., 2014). In the case of Sindbis virus infection, there is a large accumulation of genomic and subgenomic RNAs in the infected cells that sequester HuR in the cytoplasm, preventing it from interacting with other cellular mRNAs. HuR is mainly present in the nuclei of cells, and its interaction with cellular transcripts prevents their degradation. The sponging of this protein in Sindbis virus infection most likely alters the regulation of cellular gene expression preventing the antiviral response of the cell (Barnhart et al., 2013). In addition, it has been recently shown that HuR specifically protects IFN- β mRNA from degradation (Herdy et al., 2015). Although we have not demonstrated that this is the case in rotavirus-infected cells, considering that most HuR seems to be sequestered by viral RNA in the cell cytoplasm, it is conceivable that this protein can no longer bind to and protect cellular mRNAs, causing their degradation; among these mRNAs could be the IFN- β mRNA and possibly several other genes of the innate immune response of the cell. Thus, it is tempting to propose that the sponging of cellular RBPs by rotavirus RNAs could be a strategy, not very refined, but effective

Fig. 7. Effect of the characterized RBPs in the replicative cycle of rotavirus. A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs, and 72 h post-transfection were infected with RRV at an MOI of 5, and 8 hpi cells were lysed and the proteins were resolved in an SDS-10% PAGE, transferred to nitrocellulose and the indicated proteins were detected by immunoblot analysis using the indicated antibodies, anti-Vimentin (Vim), or anti Hsc70 (Hsc70) were used as loading controls. B) Total RNA was extracted from cell lysates with Trizol and the levels of rotavirus RNA gene segment 10, and 18S RNA were quantitated by RT-qPCR as indicated under Materials and Methods. The results were normalized to the levels of total 18S ribosomal RNA (rRNA18S) detected in each RNA sample. The RT-qPCR results are expressed as fold increase relative to the amount of gene 10 RNA present in infected cells that were transfected with the irrelevant control siRNA (Irr), which was taken as 1. The arithmetic means \pm standard deviation of three independent experiments performed in triplicate are shown. C) In parallel wells, cells treated as in A) were harvested 15 hpi, lysed and the virus titer was determined by an immunoperoxidase focus forming assay as described under Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the infectivity obtained when the cells were transfected with an irrelevant siRNA (Irr), which was taken as 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviation of three independent experiments performed in

nonetheless, to suppress the antiviral responses of the host cell. None of the RBPs characterized in this work by itself seem to be able to significantly reduce the replication of rotavirus, but their activities might add-up to control viral replication. The sponging of these proteins by the huge amount of viral RNA that accumulates in the infected cell might be an effective, non-targeted viral response to control the action of these cellular RBPs.

4. Materials and methods

4.1. Cell culture and viruses

The rhesus monkey epithelial cell line MA104 (ATCC) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) reduced serum (Thermo Scientific HyClon, Logan, UT) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Kansas, MO), at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere and was used for all experiments carried out in this work. The simian rotavirus strain RRV used in this work, was originally obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA). The virus was propagated in MA104 cells as described previously (Pando et al., 2002). Prior to the infection, RRV was activated with trypsin (10 µg/ml, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) for 30 min at 37 °C.

4.2. Antibodies

Polyclonal antibodies to purified RRV TLPs and to vimentin were produced in rabbits as described previously (Lopez et al., 2005). Rabbit polyclonal sera to NSP2, has been described previously (Gonzalez et al., 1998). Monoclonal antibodies to Dcp1, Xrn1 and PPI were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), GW182, and Ago2 were obtained from Abcam (Cambridge, MA) anti-HuR from Clontech (Hartford, CT), anti-Hsc70 and anti Hsp70 from StressGen (San Diego, CA). Alexa Fluor 488- and 568-conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Eugene, OR), horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from KPL (Gaithersburg, MD), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse was from Millipore Merck KGaA (Darmstadt, Germany), and Dynabeads Protein G-LS10003D were from Thermo Scientific (Waltham, MA).

4.3. Infection of cells and titration of viral progeny

Cell monolayers in 24 or 48 wells plates were infected with an MOI of 5 and then incubated for 15 h. At this time cells were lysed by two freeze-thaw cycles, and the lysates were treated with 10 µg/ml of trypsin for 30 min at 37 °C. Infection titers of the viral preparation were obtained by an immunoperoxidase assay. Briefly, confluent cells in 96 wells plates were adsorbed with two-fold serial dilution of the above-mentioned viral lysate for 60 min at 37 °C. After adsorption, virus inoculum was removed, cells were washed once, fresh MEM was added, and the infection was left to proceed for 14 h for RRV at 37 °C. RRV-infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay using a rabbit hyperimmune serum to rotavirus, as described previously (Gutierrez et al., 2010). The numbers of focus-forming units (ffu's) were counted with Visiolab 1000 station (Biocom, France) as previously reported (Guerrero et al., 2000).

4.4. siRNA transfection

The small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO). The sequence of the siRNAs against the rotavirus genes used in this work, have been previously reported (Montero et al., 2008). DCP1, Xrn1, Gw182, Ago2, HuR and the irrelevant control "NonTargeting" siRNAs were obtained from Dharmacon. Transfection of siRNAs into MA104 cells was performed in 48-well plates using a reverse transfection method as described previously (Gutierrez et al., 2010). Briefly, the siRNAs were transfected

using Oligofectamine (Invitrogen, Eugene, OR), the transfection mixture was added to cells and kept for 12 h at 37 °C, after this time, the transfection mixture was replaced with MEM, and cells were incubated for 36 h at 37 °C prior to virus infection.

4.5. Semi-purification of viral particles

MA104 cells grown in six well plates were transfected with siRNAs as previously mentioned, and 72 h post-transfection were infected with RRV at an MOI of 5. Twelve hpi cells were harvested by scraping in TNC buffer (10 mM Tris-HCl [pH7.5], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂), sonicated 3 times for 20 s on ice, and centrifuged at 1000 rpm for 5 min to remove cell debris. The supernatant was then extracted with Freon, and the aqueous phase was layered on top of a 2 ml 40% sucrose cushion and centrifuged for 2 h at 40,000 rpm at 4 °C in an SW40 rotor. The pellet containing the viral particles was resuspended in 100µl of TNC buffer, quantified by Nanodrop and used for infectivity assays as previously described.

4.6. Immunofluorescence

MA104 cells grown on glass coverslips were transfected or mock transfected and infected or mock-infected as indicated in the Figure Legends. At 4, 6 or 8 h post-infection (hpi), cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature and the coverslips were washed twice with washing buffer (PBS with 50 mM ammonium chloride). Fixed cells were permeabilized by incubation in 0.5% Triton X-100 in PBS with 50 mM ammonium chloride for 15 min at room temperature, and then were blocked by incubation with 1% bovine serum albumin (BSA), 50 mM NH₄Cl in PBS at room temperature for 1 h. The coverslips were incubated for 1 h with primary antibodies diluted in blocking buffer (PBS, 50 mM NH₄Cl, 1% BSA) at room temperature, and washed three times in washing buffer. The cells were incubated with the secondary antibody in blocking buffer for 1 h at room temperature, washed 3 times and incubated with 30 nm 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Invitrogen, Eugene, OR) for 30 min, and finally washed 4 times with washing buffer and mounted on glass slides with Citifluor AF1 (Emsdiasum, Hatfield Penn). The slides were analyzed with a Zeiss "Axioskop 2 mot plus" epifluorescence microscope coupled to a photometrics CoolSNAP HQ2 CCD camera. For confocal images we use an Olympus confocal Fluoview 1000 multifotonic or a 3I Marianas spinning disk confocal microscope. The quantitative colocalization analysis of NSP2 with GW182 and Ago2 was performed using stacks of confocal images analyzed with the plugin "Coloc 2" of the Fiji-imageJ software, to determine Manders'(M) colocalization coefficient (Costes et al., 2004; Manders et al., 1993).

4.7. End point RT-PCR analysis of RNA segment 10

Total RNA was isolated from protein G immunoprecipitates, or from total non-precipitated cell lysate using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as indicated by the manufacturer. cDNA was reverse transcribed from 1 µg of total RNA using the M-MuLV reverse transcriptase (NEBioLabs) and amplified with Vent polymerase (NEBioLabs) using the following primers: YM10-5': CAGACCCGGGTACCTTTTAAA AGTTCTGTTCC and YM10-3': CAGACCCGGGCCGCGGTACACATTAAGA CCGTTC; the amplified fragment of ~700 bp corresponding to gene segment 10, was separated in 0.8% TAE-agarose gels, visualized by ethidium bromide staining, and detected using a Typhoon FLA9500 (GE).

4.8. Real time RT-PCR analysis

Confluent MA104 cells in 48-well plates were infected with RRV and harvested at different time points with Trizol. Total RNA was purified

and treated with RNA-free DNase (Roche, Basel, Switzerland) to eliminate possible DNA contamination. The primers used for the amplification of rotavirus RNA segment 10 have been described previously (Ayala-Breton et al., 2009). To determine the levels of the positive RNA strand, RT-qPCR was performed separating the reverse transcription and the PCR steps, as described by Ayala-Breton et al. (2009). Quantitative analysis of data was performed using Prism 7000 analysis software (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). The results were normalized to the levels of total 18S ribosomal RNA (rRNA18S) detected in each RNA sample. The changes in gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, where CT is the threshold cycle (Livak and Schmittgen, 2001). The sequence of the rRNA 18S primers used in these assays were: rRNA18sfw: CGAAAGCATTGCCAAGAAT, and rRNA18srv: GCATCGTTTATGGTCGGAAC

4.9. Immunoblot analysis

Cells were lysed in Laemmli sample buffer and denatured by boiling for 5 min. Proteins in cell lysates were separated in SDS-10% PAGE and transferred to Immobilon NC (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) membranes. The membranes were blocked by incubation with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature, and with primary antibodies diluted in PBS containing 5% milk, followed by an incubation with secondary, species-specific, horseradish peroxidase-conjugated antibodies, as previously reported (Gutierrez et al., 2010). The peroxidase activity was developed using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA), following the manufacturer's instructions. The blots were also probed with an anti-vimentin antibody, which was used as a loading control. Finally, the quantification analysis was performed using ImageJ software.

4.10. Immunoprecipitation assays

Confluent MA104 cells grown in 150 mm² flasks were infected with RRV at an MOI of 5, and 8 hpi cells were washed with PBS, scraped, collected and sonicated 4 times for 5 s at 4 °C; the cell extract was centrifuged at 1000 rpm for 5 min at 4 °C and the supernatant was collected. 1 ml of the cell lysate were precleared by incubation with 100 µl of protein-G magnetic beads at 4 °C for 1 h. The precleared supernatants were incubated with 1–5 µg of the indicated mAbs for 1 h at 4 °C with agitation, a fresh suspension of protein G beads was added and incubated 2 h at 4 °C with agitation. After this time the beads were washed 3 times with RIPA Buffer (1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% SDS) and finally the magnetic beads were divided in two tubes, one was resuspended in Laemmli Buffer, and denatured by boiling for 5 min. Proteins in the immunoprecipitates were separated in SDS-10% PAGE and transferred to Immobilon NC (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) membranes and analyzed by immunoblot using the same antibodies that were used for the IPP assay. The remaining tube of each IPP was extracted with Trizol and subjected to RT-PCR.

Acknowledgements

We are grateful to Rafaela Espinosa, and Marco Antonio Espinoza for their excellent technical assistance, and to Roberto P. Rodríguez-Bahena for software support. The services of the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) funded by CONACyT are deeply recognized.

Funding

This work was supported by Grants IG200317 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional

Autónoma de México, and 153639 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. AO was a recipient of a scholarship from CONACyT.

References

- Abdelmohsen, K., Gorospe, M., 2010. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 1, 214–229.
- Anderson, P., Kedersha, N., 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33, 141–150.
- 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.
- Barnhart, M.D., Moon, S.L., Emch, A.W., Wilusz, C.J., Wilusz, J., 2013. Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus. *Cell Rep.* 5, 909–917.
- Bhowmick, R., Mukherjee, A., Patra, U., Chawla-Sarkar, M., 2015. Rotavirus disrupts cytoplasmic P bodies during infection. *Virus Res.* 210, 344–354.
- Bidet, K., Dadlani, D., Garcia-Blanco, M.A., 2014. G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS Pathog.* 10, e1004242.
- Charley, P.A., Wilusz, J., 2014. Sponging of cellular proteins by viral RNAs. *Curr. Opin. Virol.* 9, 14–18.
- Ciarlet, M., Conner, M.E., Finegold, M.J., Estes, M.K., 2002. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J. Virol.* 76, 41–57.
- Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbins, Z., Pavlakis, G., Lockett, S., 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* 86, 3993–4003.
- Crawford, S.E., Ramani, S., Tate, J.E., Parashar, U.D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M.A., Greenberg, H.B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M.K., 2017. Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17083.
- Decker, C.J., Teixeira, D., Parker, R., 2007. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 179, 437–449.
- Diaz-Salinas, M.A., Silva-Ayala, D., Lopez, S., Arias, C.F., 2014. Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *J. Virol.* 88, 4389–4402.
- Estes, M.K.A.G., H.D., 2013. Rotaviruses and their replication. In: Knipe, D.N., Howley, P.M. (Eds.), *Field’s Virology*, 6th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1347–1401.
- García-Yague, A.J., Rada, P., Rojo, A.I., Lastres-Becker, I., Cuadrado, A., 2013. Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 protein in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 288, 5506–5517.
- Gonzalez, R.A., Torres-Vega, M.A., Lopez, S., Arias, C.F., 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* 143, 981–996.
- Guerrero, C.A., Zarate, S., Corkidi, G., Lopez, S., Arias, C.F., 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74, 9362–9371.
- Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., Lopez, S., 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 84, 9161–9169.
- Herdy, B., Karonitsch, T., Vladimer, G.I., Tan, C.S., Stukalov, A., Trefzer, C., Bigenzahn, J.W., Theil, T., Holinka, J., Kiener, H.P., Colinge, J., Bennett, K.L., Superti-Furga, G., 2015. The RNA-binding protein HuR/ELAVL1 regulates IFN-beta mRNA abundance and the type I IFN response. *Eur. J. Immunol.* 45, 1500–1511.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lopez, T., Camacho, M., Zayas, M., Najera, R., Sanchez, R., Arias, C.F., Lopez, S., 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79, 184–192.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169, 375–382.
- 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.
- Moon, S.L., Wilusz, J., 2013. Cytoplasmic viruses: rage against the (cellular RNA decay) machine. *PLoS Pathog.* 9, e1003762.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F., Lopez, S., 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295, 190–200.
- Patel, P.H., Barbee, S.A., Blankenship, J.T., 2016. GW-bodies and P-bodies constitute two separate pools of sequestered non-translating RNAs. *PLoS One* 11, e0150291.
- Poblete-Duran, N., Prades-Perez, Y., Vera-Otarola, J., Soto-Rifo, R., Valiente-Echeverria, F., 2016. Who regulates whom? An overview of RNA granules and viral infections. *Viruses* 8.
- Rubio, R.M., Mora, S.I., Romero, P., Arias, C.F., Lopez, S., 2013. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J. Virol.* 87, 6336–6345.
- Sanchez-Tacuba, L., Rojas, M., Arias, C.F., Lopez, S., 2015. Rotavirus controls activation of the 2’-5’-oligoadenylate synthetase/RNase L pathway using at least two distinct mechanisms. *J. Virol.* 89, 12145–12153.
- Tsai, W.C., Lloyd, R.E., 2014. Cytoplasmic RNA granules and viral infection. *Annu. Rev. Virol.* 1, 147–170.

Review

Stress Response and Translation Control in Rotavirus Infection

Susana López *, Alfonso Ocegüera and Carlos Sandoval-Jaime

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; oca@ibt.unam.mx (A.O.); carlossj@ibt.unam.mx (C.S.-J.)

* Correspondence: susana@ibt.unam.mx; Tel.: +52-777-3291612; Fax: +52-777-3311470

Academic Editor: Craig McCormick

Received: 7 April 2016; Accepted: 31 May 2016; Published: 7 June 2016

Abstract: The general stress and innate immune responses are closely linked and overlap at many levels. The outcomes of these responses serve to reprogram host expression patterns to prevent viral invasions. In turn, viruses counter attack these cell responses to ensure their replication. The mechanisms by which viruses attempt to control host cell responses are as varied as the number of different virus families. One of the most recurrent strategies used by viruses to control the antiviral response of the cell is to hijack the translation machinery of the host, such that viral proteins are preferentially synthesized, while the expression of the stress and antiviral responses of the cell are blocked at the translation level. Here, we will review how rotaviruses, an important agent of acute severe gastroenteritis in children, overcome the stress responses of the cell to establish a productive infectious cycle.

Keywords: rotavirus; antiviral response; stress response; unfolded protein response; protein synthesis; RNA granules; stress granules; processing bodies

1. Introduction

To successfully replicate, viruses have to cope with the stress and antiviral responses of the host cell. In addition to virus infections, eukaryotic cells encounter a range of physiological and environmental stressful conditions that require adaptive immune responses that induce the coordinated expression of genes affecting cell survival, apoptosis, cell-cycle progression, and differentiation. The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle that integrates signals from throughout the cell to orchestrate a coordinated response in these situations. It is the ER where the folding of proteins takes place. Accumulation of misfolded proteins causes ER stress and leads to activation of a coordinated adaptive program called the unfolded protein response (UPR) (reviewed in [1,2]). Also, under stressful conditions cells react with the formation of stress granules (SGs). These are cytoplasmic aggregates of stalled translational pre-initiation complexes that accumulate during stress, increase the amount of Processing Bodies (PBs), which are involved in RNA turnover, and halt the synthesis of most proteins [3,4]. In cells infected with rotavirus there is a shut-off of cell protein synthesis, however, stress granules are not formed, the number of PBs is decreased, and the UPR does not appear to be completely activated. Here we summarize what is currently known about the mechanisms by which rotaviruses evade these responses of the host cell.

2. Rotavirus

Rotaviruses are the leading etiologic agents of severe diarrheal disease in infants and young children, being responsible for approximately 200,000 annual deaths globally, and placing a significant economic burden on the global health care system [5–7]. Two live attenuated vaccines that protect

against the severe form of the disease have been recently licensed, however, the effectiveness of these vaccines is low in developing countries, where rotavirus vaccination is needed most [8–10], reinforcing the need to develop alternative approaches to control the infection caused by rotaviruses. Essential for these developments is a basic understanding of the molecular mechanisms by which these viruses interact with their host cell.

As members of the family *Reoviridae*, rotaviruses have a genome made of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) that is enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. During cell entry, the viral particle uncoats, losing the two outer surface proteins, VP4 and VP7, and yielding a double-layered particle (DLP) that is transcriptionally active. The viral transcripts direct the synthesis of six structural viral proteins (VPs) and six non-structural proteins (NSPs), and also serve as templates for the synthesis of the complementary strand of the genomic RNA [11]. Early in the infection, once a critical mass of viral proteins is accumulated, large cytoplasmic inclusions termed viroplasm are formed of which the rotavirus NSP2 and NSP5 proteins are essential constituents. The replication of the viral genome, and the assembly of progeny DLPs take place in these structures. The newly synthesized DLPs bud through the ER membrane, modified by the viral transmembrane nonstructural protein NSP4, to yield a particle with an intermediary envelope onto which the outer layer proteins are assembled, the envelope is then lost. The mature viral particles are released by cell lysis or by exocytosis, depending on the cell line [11].

3. Protein Synthesis

As with every process in the cell, the process of protein synthesis is highly regulated, primarily at the level of initiation [12]. In eukaryotic cells, mRNA translation initiation includes the recruitment of mRNAs by the eIF4F complex, and the assembly of the 40S and 60S ribosomal subunits; this process is mediated by the eukaryotic initiation factors (eIFs). The eIF4F complex is constituted by several canonical eIFs which play different roles during translation initiation; eIF4E the cap-binding protein, recognizes the cap structure (m⁷GpppG) at the 5′ end of mRNAs; eIF4A is an ATP-dependent RNA helicase that unwinds secondary structures of the mRNAs, and eIF4G, functions as a scaffolding protein on which several eIFs interact. This complex promotes the interaction of the mRNA with the 40S ribosomal subunit [13]. Once the 40S ribosomal subunit is bound to the mRNA, the mRNA is scanned in the 5′–3′ direction, until the first AUG codon surrounded by optimal consensus sequences is found and selected for translation initiation [14] (Figure 1A). A ternary complex (TC) composed of eIF2-GTP-Met-tRNA charges the initiator Met-tRNA to begin translation, and the 60S ribosomal subunit is then joined to form an 80S initiation complex. eIFs are released with the assistance of eIF5, which facilitates the hydrolysis of GTP to GDP carried out by eIF2. The binary complex formed by GDP-eIF2 is recycled by eIF2B that exchanges GDP for GTP, and a new tRNA-Met is loaded to form a ternary complex, ensuing new rounds of initiation [13,15]. The exchange of GDP for GTP in eIF2 is the rate-limiting step in the formation of the ternary complex, and this is regulated by eIF2B (Figure 1B). The two main checkpoints to control translation initiation are the regulation of the activity of eIF2, and the formation of the eIF4F complex. Interestingly, both represent particular targets during the infection by different viruses [16].

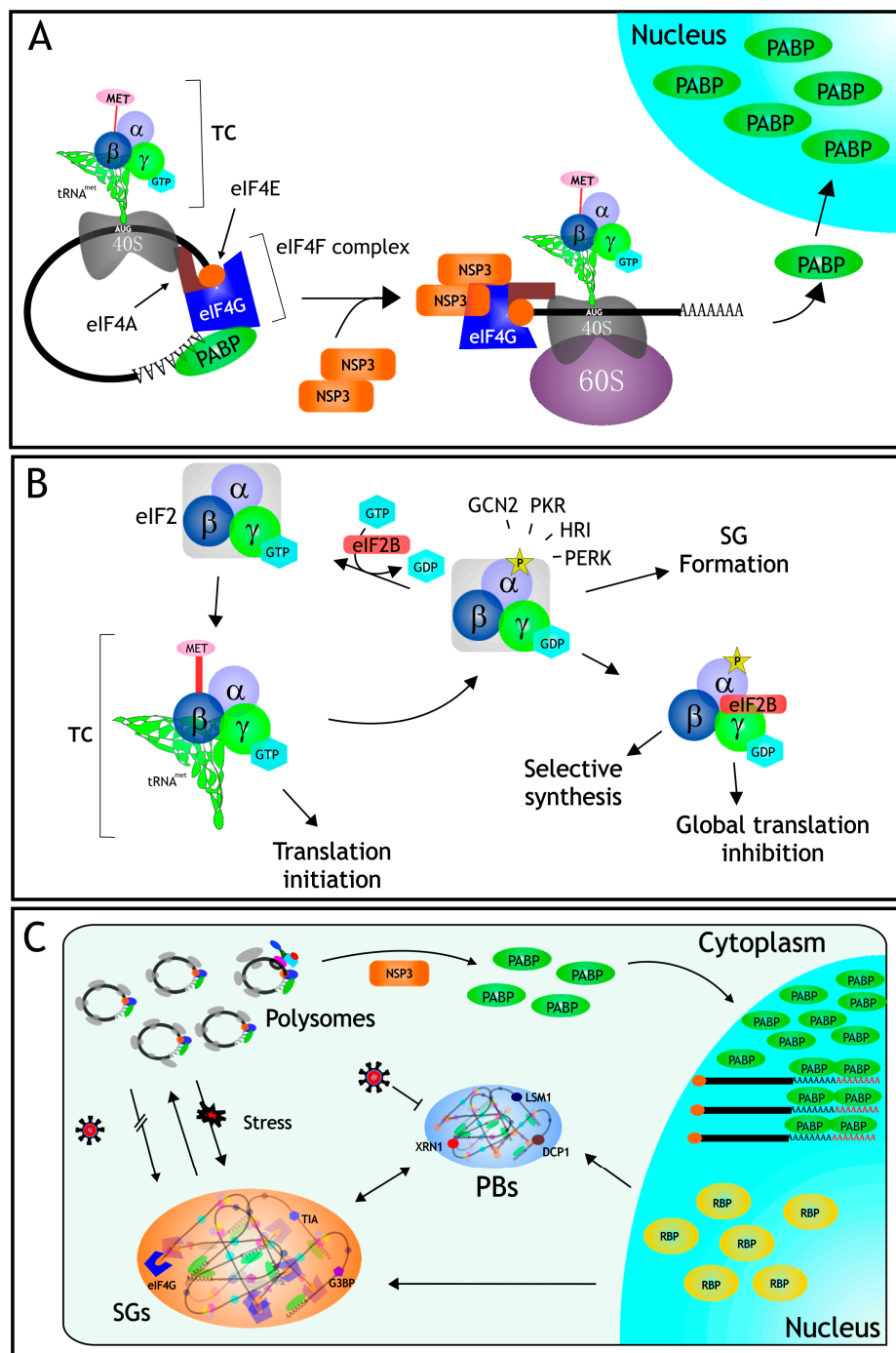


Figure 1. Translation control in rotavirus infected cells. (A) During the infection, the nonstructural protein NSP3 interferes with the translation machinery by displacing PABP from its site of binding in eIF4G, and also by indirectly causing the nuclear relocalization of PABP, and the accumulation and hyperadenylation of poly(A)-containing mRNAs (see text); (B) eIF2 is a heterotrimer formed by subunits (α , β , and γ); it binds to GTP and $tRNA^{Met}$ forming the ternary complex (TC) which is in charge of loading the initial Met residue during protein translation. During rotavirus infection, the α subunit of eIF2 becomes phosphorylated by PKR, preventing the formation of the TC, and thus causing a global translation inhibition; (C) Even under these severe inhibitory translation conditions caused by the infection, the formation of stress granules (SGs) is prevented, and the amount of processing bodies (PBs) decreases, despite the fact that several of the RBPs that assemble these RNA granules exit from the nucleus (see text for details).

4. mRNA Translation in Rotavirus Infected Cells

Rotavirus takes over the host translation machinery early in the infection process causing a shut-off of cell protein synthesis, and favoring a robust synthesis of viral proteins such that, by the end of the infection process, most of the newly synthesized proteins in rotavirus-infected cells are viral proteins. To characterize the mechanism by which rotaviruses take over the cellular protein synthesis machinery, several groups have studied the role that viral mRNAs and viral proteins play in this control. In contrast to most cellular mRNAs, rotavirus mRNAs while being capped, are not polyadenylated. Instead, viral mRNAs have a consensus sequence (GACC) at their 3' end that is conserved in all 11 viral genes [17]. The sizes of the 5' and 3' UTRs of viral mRNAs are shorter than those of most cellular mRNAs; the 5' UTR varies, depending on the specific gene segment, between 9 and 48 bases while the 3' UTR range from 17 to 182 bases [11].

The role of the UTRs and the 3' terminal sequence have been studied by different groups using several experimental paradigms. The translation of chimeric reporter genes containing either the 5' or 3' rotavirus UTRs, or both [18–23], has been analyzed in *in vitro* translation systems in the presence or absence of viral proteins [19,23]. They have also been assayed in different cell lines in which reporter genes have been transfected by either lipofection or electroporation, and their expression has been analyzed in cells infected or not with rotavirus, and in the presence or absence of NSP3. In summary, the results in cells in culture have shown that the GACC-3' terminal sequence of the viral mRNAs is a translational enhancer that is functional only in infected cells, and depends on the presence of viral proteins, in particular NSP3 (see below), and probably others [20]. Interestingly, in these assays, an enhancement in the translation of the transfected poly(A)-containing reporters has also been observed in infected cells as compared to mock-infected cells [20,22]. The role of the 5' UTR does not seem to be very relevant for the preferential translation of viral *vs.* cellular mRNAs, but the requirement for the cap structure in the 5'-terminal end to improve the translation of the chimeric reporter genes was clearly established [18,21].

5. The Role of the Nonstructural Protein NSP3 during mRNA Translation

One of the proteins with a relevant participation in the control of cellular mRNA translation and regulation of translation of the viral transcripts is the nonstructural protein NSP3. It has a molecular weight of ~36 kDa, forms homodimers, and several distinct domains have been mapped to different regions of protein (Figure 2). The N-terminal domain (aa residues 1–149) of two NSP3 monomers form an asymmetrical RNA-binding pocket that recognizes the rotaviral mRNA 3' GACC consensus sequence [17,24–27], while the C-terminal domain (aa residues 206–313) binds to eIF4G in a region that overlaps with the binding site for the poly(A) binding protein (PABP) [25,26,28]. NSP3 also contains a dimerization domain in the central region of the protein (aa 150–241) that is predicted to form a coiled-coil structure allowing NSP3 dimer formation, and it has been shown that within this region there is a site of interaction with a cellular protein named RoXaN (Rotavirus X protein associated with NSP3); the function of this protein in uninfected as well as in rotavirus-infected cells is still unknown [29]. It has also been shown that the region between amino acid residues 225–258 of NSP3 interacts with Hsp90 and this interaction protects it from proteasomal degradation and helps in the assembly of functionally active dimers of NSP3 [30].

Since NSP3 dimers interact with eIF4G in the same region as PABP does, but with higher affinity [24], it has been proposed that during rotavirus infection NSP3 evicts PABP from eIF4G, impairing the translation of cellular mRNAs, while leading to the enhancement of translation of rotaviral mRNAs [26]. This model was supported by the observation that the synthesis of cellular proteins was severely decreased in cells in which NSP3 was heterologously expressed using a recombinant vaccinia virus [31], and also by *in vitro* translation experiments in which a recombinant NSP3 and its domains were found to stimulate the translation of reporter mRNAs containing the 3' terminal consensus sequence GACC [23,32]. Interestingly, despite the essential role proposed for NSP3 in infected cells, silencing the expression of this protein by RNA interference (RNAi) experiments

showed that, while NSP3 indeed blocked the translation of cellular mRNAs, it was not required for the efficient translation of viral mRNAs. It was also found that the knockdown of NSP3 resulted in an increased production of viral progeny (three-fold more infectious viruses were produced as compared to cells silenced with a control siRNA), and this increase correlated with an increase in the amount of viral mRNA and dsRNA produced under these conditions [33]. Arguments against these assays raise the question as to whether even small undetected amounts of NSP3 are able to initiate the synthesis of viral proteins, at a time in the infection where there is little viral mRNA to compete with the cellular mRNAs [20]. These arguments however, do not explain why more viral progeny is produced under these conditions. Differences in the viral strains used (bovine strain RF or simian strain RRV) and in the cell lines, or in the experimental paradigms used may also account for these discrepancies.

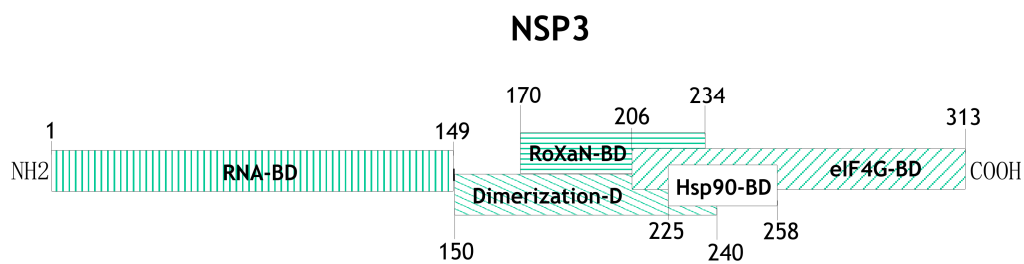


Figure 2. Schematic representation of the different functional domains that have been mapped on NSP3. Numbers indicate the amino acid positions at which each domain starts and ends (BD = binding domain). See text for details and references.

Recently, the translation of reporter genes flanked by either viral or cellular UTRs was compared in cells infected with rotavirus or mock-infected [20,22], or in cells transfected with a plasmid expressing NSP3 [20]. It was found that NSP3 (either produced by the infection, or from a plasmid encoding it) is able to enhance the translation not only of viral RNAs, but also of poly(A)-containing mRNAs. It has been suggested that this viral protein might favor the interaction between the cap-binding protein eIF4E and eIF4G and that it could act as a surrogate PABP during translation initiation; thus, NSP3 *per se* might not be the only factor that inhibits the translation of poly(A)-containing mRNAs in rotavirus-infected cells [20].

In fact, it was recently reported that NSP3 has an additional mechanism to prevent the translation of cellular mRNAs: PABP is a shuttling protein that assists the transport of mRNAs from the nucleus to the cytoplasm, where they become accessible to the translation machinery; during rotavirus infection, PABP becomes accumulated in the nucleus of infected cells [22,34–36], and it was found that NSP3, and more precisely the eIF4G-binding domain of this protein, is important for the nuclear localization of PABP [35,36]. NSP3 does not directly interact with PABP [35,36], and silencing the expression of either eIF4GI or eIF4GII, or both, by RNAi in rotavirus-infected cells did not affect the accumulation of PABP in the nucleus, indicating that the displacement of PABP from its binding site on eIF4G is not directly related to its change of localization [22]. Also, it has been proposed that the interaction of NSP3 with RoXaN might be important for the nuclear localization of PABP in infected cells [35]. Interestingly, it was also found that a mutant virus with a partially duplicated NSP3 gene that encodes a protein almost twice as big as the wild type protein, and that has a decreased ability to bind to eIF4G, failed to induce the localization of PABP in the nucleus and to prevent the translation of poly(A)-containing RNAs. Despite this fact, the synthesis of proteins of this mutant and its replication were no different from its wild type counterpart, suggesting that the functions of NSP3 might not be essential for the efficient growth of rotavirus in permissive cell lines [34], and gives support to the observations that silencing the expression of this protein by RNAi has little effect on viral protein synthesis.

The accumulation of PABP in the nucleus of rotavirus infected cells also resulted in the accumulation and hyper-polyadenylation of poly(A)-containing mRNAs [22], suggesting that the shutoff of cell protein synthesis during the infection might be due to a blocking of the nucleo-cytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. This model is supported by the observation that a reporter gene transfected as a plasmid or as a polyadenylated mRNA in rotavirus infected cells had different outcomes; while

the translation of the reporter encoded in the plasmid was reduced in infected cells, the translation of mRNAs directly transfected to the cytoplasm was not affected. Also, the nucleo-cytoplasmic distribution of cellular mRNAs was altered in rotavirus-infected cells, since cellular mRNAs accumulated in the cell nucleus as a function of the time post-infection [22].

In rotavirus-infected cells the inhibition of cell protein synthesis is also mediated by a second mechanism since the α subunit of eIF2 becomes phosphorylated early after infection and is maintained in this state throughout the virus replication cycle [36]. When eIF2 α is phosphorylated, the exchange of GDP to GTP catalyzed by eIF2B is inhibited, and the eIF2-GDP complex binds with higher affinity to eIF2B preventing its activation. This, in turn, reduces the formation of pre-initiation translation complexes, causing a reduction in global translation [13] (Figure 1B). The permanent phosphorylated status of eIF2 α is beneficial for the virus, since under these conditions the viral mRNAs are efficiently translated, while the synthesis of most cellular proteins stops. There are four different kinases that are capable of phosphorylating eIF2 α at the same position (Ser-51). These kinases respond to different stress conditions: HRI is activated by heme deficiency, arsenite treatment, or heat shock; PKR is activated by the presence of dsRNA; PERK becomes active when the ER is under stress; and GCN2 is activated under amino acid starvation conditions [37,38]. It has been established that the kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 α during rotavirus infection is PKR, since in PKR-knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs), or in cells where PKR was knocked-down by RNAi, eIF2 α was not phosphorylated upon rotavirus infection. The translation of rotavirus mRNAs is neither affected by the phosphorylation of eIF2 α , nor does it depend on it, since viral mRNAs and viral replication are equally effective in cells with or without PKR [39].

Despite the severe translation conditions imposed by virus infection to the host cell, with little ternary complex available to initiate protein synthesis, the viral transcripts are efficiently translated. The molecular mechanisms by which viral protein synthesis takes place have not been identified. However, it has been found that the amount of viral transcripts produced is in the range of 10s of 1000s of molecules per cell, which is only about 10 times short of the amount of the 18S rRNA present in the cell [22]. The huge number of viral mRNAs (of low complexity, since they represent only 11 different transcripts) in a cell where the translation of poly(A)-containing mRNAs is inhibited by at least three different mechanisms (phosphorylation of eIF2 α , poly(A)-containing mRNAs sequestered in the nucleus, and eviction of PABP from eIF4G), leaves the translation of viral mRNAs with little competition for the protein synthesis machinery and explains the severe inhibition of host translation caused by rotaviruses.

6. RNA Granules

RNA granules are aggregates of RNA and proteins that are present in all eukaryotic cells and play distinct roles in gene regulation, metabolic homeostasis, and response to stress. The two main cytoplasmic RNA granules are Stress Granules (SGs), which are dynamic cytoplasmic aggregates of stalled translational pre-initiation complexes that accumulate during stress, and Processing Bodies (PBs), which contain proteins involved in RNA degradation. The distribution of eukaryotic mRNA between polysomes, SGs, and PBs, in a given cell condition, determines the rate of mRNA translation and degradation, thus influencing gene expression [40,41]. Since SGs and PBs have fundamental roles in the fate of cellular and viral mRNAs, viruses have developed diverse measures to prevent the deleterious effect of these structures during their replicative cycles (reviewed in [42]).

6.1. Stress Granules

Besides its effect on protein translation, the phosphorylation of eIF2 α is one of the signals that trigger the formation of SGs. It is thought that SGs are sites in which the integrity and composition of mRNAs is monitored, and they are then sent either to translation, degradation, or storage. mRNAs stored in SGs are not degraded, and they are used for rapid reinitiation of translation in cells recovering from stress (reviewed in [4]). These RNA granules contain the small ribosomal subunit, several eIFs,

like eIF3, eIF4G, and eIF4E, and PABP and several RNA binding proteins (RBPs) like HuR, G3BP, TIA-1, and TIAR, among others, which are used as markers for these cytoplasmic inclusions (reviewed in [43]). Since the main function of SGs is to arrest protein synthesis until the stressful conditions are resolved, viruses have to deal with these structures in order to ensure the translation of their mRNAs, and various strategies have been developed, including the occupation of these structures during their replication or preventing their formation through different mechanisms [44]. Under stress conditions, the formation of the pre-initiation complex is blocked, either because eIF2 α is phosphorylated, the helicase eIF4A is inhibited, or eIF4G is cleaved, and this arrest in translation triggers a signal that causes that several nuclear RBPs, like TIA-1, TIAR, HuR, and G3BP, move to the cytoplasm, where they rapidly aggregate to form the SGs [4], although the precise mechanism involved in SGs formation is still poorly defined.

In rotavirus-infected cells, even though eIF2 α is phosphorylated, these granules are not formed despite the fact that TIA-1 exits the nucleus, suggesting that the virus prevents the assembly of these structures, probably by a mechanism that allows the translation of its own mRNAs [36]. Furthermore, it has been shown that rotaviruses are able to prevent the formation of SGs, since these structures are not formed in cells infected with rotavirus when induced to form SGs by treatment with arsenite, a well-characterized SG inducer. The mechanism by which the formation of these structures is prevented during the infection remains to be determined.

6.2. Processing Bodies

SGs are closely linked to PBs which contain besides RNA, several enzymes of the RNA decay machinery. In contrast to SGs, PBs are constitutively present in the cytoplasm of cells, although their number and size vary depending on the stress conditions of the cell. There is a variety of proteins present in PBs, which define different subsets of these foci, including proteins involved in mRNA decapping (Dcp1a/Dcp2, and Edc3), decapping enzymes (Ccr4, Caf1, Pan2, and Pan3), exonucleases (Xrn1), and RNA binding proteins involved in RNA silencing and in RNA nonsense mediated decay, like DDX3, Rck/p54, GW182, and Lsm1 [45–47]. The mechanism of PB formation, similar to that of SGs, is not clear, but it involves the aggregation of the RBPs around mRNAs. It has also been proposed that there is a dynamic exchange of mRNAs between PBs and SGs [48].

It was recently found that different rotavirus strains are able to inhibit or decrease the formation of PBs during the infection. It was reported that the deadenylating Pan3 enzyme was sent to degradation by rotavirus NSP1, while the exonuclease Xrn1 and the decapping enzyme Dcp1 were relocalized from the cytoplasm to the nucleus, and it was also shown that these three PB-components are able to interact, directly or indirectly, with viral RNA [49]. However, the molecular mechanisms by which these proteins were relocalized to the nucleus was not established.

It is interesting to note that, to prevent the formation of either SGs or PBs, it is necessary that the viral particle is replication competent, since it has been shown that transfection of cells with UV-psoralen-inactivated particles do not disrupt the formation of the RNA granules, suggesting that a newly synthesized viral product (either viral RNA or protein) is needed to control the formation of these structures [36,49]. Since several of the components of RNA granules are RBPs, it is tempting to suggest that, during infection, the vast amount of viral transcripts synthesized outcompete the binding of these cellular proteins, functioning as “sponges” that trap RBPs, as it has been recently proposed [50], and preventing their aggregation into RNA granules; this hypothesis however, has not been experimentally verified.

7. Unfolded Protein Response

Besides viral infections, cells have to deal with a range of physiological and environmental stressful conditions that require the coordinated expression of stress-response genes. The ER is in charge of integrating these signals to implement a coordinated response, it is in this cellular organelle where the folding and post-translation modification of proteins takes place; an excess of misfolded

proteins causes ER stress and induces the activation of a response named the unfolded protein response (UPR) [1,2] (Figure 3). The main function of the UPR is to decrease the demand on the protein-folding machinery, if the ER stress is not relieved, the activation of apoptotic pathways and cell death take place [1,2]. When misfolded proteins accumulate in the lumen of the ER, three ER-resident transmembrane proteins, which act as stress sensors, are activated: the PKR-like ER kinase (PERK), the activating transcription factor 6 (ATF6), and the inositol-requiring enzyme-1 (IRE1). Under normal conditions, the luminal domain of each sensor is bound to the ER-chaperone GRP78, when UPR is triggered, GRP78 is titrated away by the misfolded proteins and releases the sensors allowing their activation. Activation of PERK and IRE1 require dimerization and autophosphorylation, while released ATF6 relocates to the Golgi where it is cleaved and activated. When PERK dimerizes, it becomes phosphorylated and then phosphorylates eIF2 α , resulting in a downregulation of general protein synthesis, and in the selective translation of ATF4 and CHOP, which in turn activate the transcription of several UPR-responsive genes encoding proteins that ameliorate the ER-stress. Both ATF4 and CHOP induce the transcription of the gene that encodes GADD34, a protein that associates with protein phosphatase 1 (PP1) that dephosphorylates eIF2 α , resulting in a negative feedback loop that recovers protein synthesis and permits the translation of the stress-induced transcripts. IRE1 has an RNase activity that upon dimerization and autophosphorylation mediates the removal of an intron from XBP1 mRNA. The spliced form of XBP1 encodes a factor that activates the transcription of genes encoding proteins involved in ER stress-associated protein degradation. Finally, when GRP78 releases ATF6, it migrates to the Golgi where it is cleaved; p50 one of the cleaved products, is a transcription factor that promotes the transcription of chaperone genes (reviewed in [51–53]).

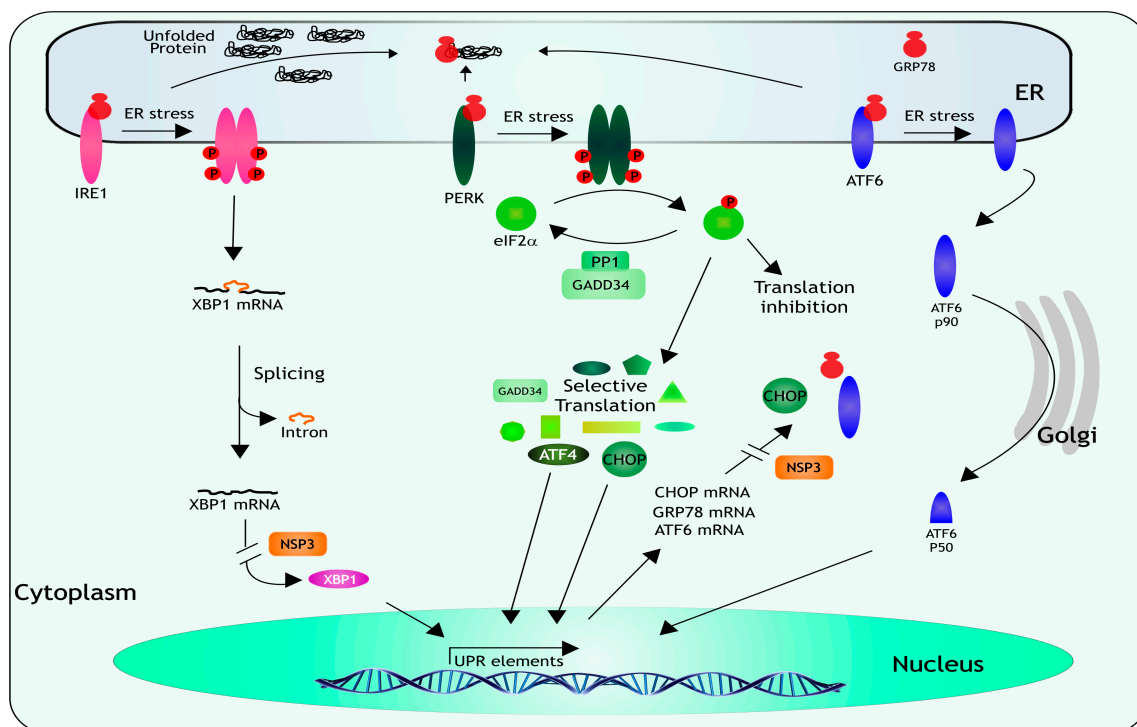


Figure 3. The unfolded protein response. When misfolded proteins accumulate in the ER lumen, GRP78 releases three ER-resident transmembrane proteins, which act as stress sensors: IRE1, PERK, and ATF6. IRE1 has an endonuclease activity that upon dimerization and autophosphorylation mediates the removal of an intron from XBP1 mRNA. The spliced XBP1 encodes a factor that triggers the transcription of genes encoding proteins involved in ER stress-associated protein degradation. Upon activation, PERK phosphorylates eIF2 α , resulting in a global inhibition of protein synthesis, and in the selective translation of ATF4 and CHOP, which activate the transcription of several UPR-responsive genes encoding proteins that mitigate the ER-stress, like GADD34, a protein that interacts with PP1 to dephosphorylate eIF2 α , to recover protein synthesis.

The characterization of the three branches of UPR in rotavirus-infected cells showed that, during the infection, the mRNA of XBP1 is spliced by IRE1, ATF6 is relocalized to the cell nucleus, PERK and eIF2 α are phosphorylated, and the transcription of GRP78 and CHOP mRNAs is induced, indicating that the UPR is activated in infected cells [54,55]. Nevertheless, the induction of this cellular response is modulated by rotavirus since GRP78, GRP94, and other proteins involved in the UPR, including PERK, CHOP, and GADD34, are relocalized to/or near viroplasm [55], and the translation of several transcripts induced during the UPR, in particular, the mRNAs for GRP78, XBP1, and CHOP is suppressed by NSP3 [54]. Thus, even though the cell triggers the UPR to confront rotavirus infection, the virus has developed diverse strategies to subvert this coordinated host response to successfully replicate.

When ATF6 is released it migrates to the Golgi where it is cleaved, p50 one of the cleavage products is a transcription factor that promotes the transcription of chaperone genes (reviewed in [51–53]). The main function of this coordinated program is to eliminate the misfolded proteins in the ER by increasing the expression of chaperone proteins and degradation factors, and by decreasing the rate of overall protein synthesis to reduce incoming protein traffic into the ER [56]. NSP3 produced in rotavirus-infected cells prevents the translation of spliced XBP1, and newly synthesized CHOP, GRP78, and ATF6 mRNAs, modulating the UPR response [54].

8. Concluding Remarks

It seems clear that the regulation of gene expression in cells infected with rotavirus is a multifactorial process. Early during the infection process, the host translation machinery is inhibited since eIF2 α becomes phosphorylated by PKR, and the nonstructural protein NSP3 displaces the interaction between PABP and eIF4G; under these conditions, the viral mRNAs are preferentially translated. As the infection proceeds, PABP is relocalized to the cell nucleus by an unknown mechanism, and the newly transcribed cellular mRNAs become hyperadenylated and accumulate in the cell nucleus, unable to reach the cytoplasm and to be translated. At the same time, viral mRNAs accumulate at high rates in the cell cytoplasm with their translation being favored over that of cellular mRNAs. By preventing the translation of cellular genes, the virus controls the activation of the antiviral and UPR responses of the host. Also, during the infection, rotavirus is capable of manipulating the formation of RNA granules, which are deleterious for the viral replication cycle, since the formation of SGs is prevented, and the amount of PBs is decreased.

There are still many questions that need to be answered to fully understand how rotaviruses establish a productive cycle in infected cells. Some of these questions are:

- How can viral and cellular mRNAs be efficiently translated although eIF2 α is phosphorylated?
- Does NSP3 participate in the relocalization of PABP to the nucleus?
- Are there additional cellular proteins that interact with NSP3?
- Why does the knockdown of NSP3 result in an increased viral progeny?
- What is the cellular function of RoXaN?
- Which viral proteins are involved in preventing the formation of SGs and PBs?
- What is the function of the UPR proteins found in viroplasm?
- Which is the consequence of suppressing the UPR in rotavirus-infected cells?

Acknowledgments: We are indebted to Carlos F. Arias for critical reading of the manuscript. Work in our laboratory relevant to this article was supported by grant 221019 from the National Council for Science and Technology (Conacyt), Mexico, and grant IG-200114 from DGAPA-UNAM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
CHOP	C/EBP Homologous Protein (CCAAT-Enhancer-Binding Protein Homologous Proteins)
DCP1	Decapping Protein 1
eIF2B	Eukaryotic Initiation Factor 2B
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha Subunit
eIF4G	Eukaryotic Initiation Factor 4G
ER	Endoplasmic Reticulum
G3BP	GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein 1
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein
GCN2	General Control Nonderepressible 2
GRP78	78 kDa Glucose-Regulated Protein
HRI	Heme-Regulated Kinase
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme-1
LSM1	U6 snRNA-Associated Sm-Like Protein
PABP	Poli(A)-Binding Protein
PBs	Processing Bodies
PERK	Protein Kinase-R-Like ER kinase
PKR	Protein Kinase-R
PP1	Protein Phosphatase 1
RBP	RNA Binding Protein
RoXaN	Rotavirus X Protein Associated with NSP3
SGs	Stress Granules
TC	Ternary Complex
TIA	T-Cell intracellular Antigen 1
UPR	Unfolded Protein Response
UTR	Untranslated Region
XBP1	X-Box Binding Protein 1
XRN1	5'-3' Exoribonuclease 1

References

1. Hetz, C.; Chevet, E.; Oakes, S.A. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 829–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ron, D.; Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 519–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Buchan, J.R. mRNP granules: Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* **2014**, *11*, 1019–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kedersha, N.; Ivanov, P.; Anderson, P. Stress granules and cell signaling: More than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 494–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lee, L.A.; Franzel, L.; Atwell, J.; Datta, S.D.; Friberg, I.K.; Goldie, S.J.; Reef, S.E.; Schwalbe, N.; Simons, E.; Strebel, P.M.; *et al.* The estimated mortality impact of vaccinations forecast to be administered during 2011–2020 in 73 countries supported by the GAVI alliance. *Vaccine* **2013**, *31*, B61–B72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tate, J.E.; Burton, A.H.; Boschi-Pinto, C.; Steele, A.D.; Duque, J.; Parashar, U.D.; Network, W.H.-C.G.R.S. 2008 Estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12*, 136–141. [[CrossRef](#)]
7. Walker, C.L.; Rudan, I.; Liu, L.; Nair, H.; Theodoratou, E.; Bhutta, Z.A.; O'Brien, K.L.; Campbell, H.; Black, R.E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* **2013**, *381*, 1405–1416. [[CrossRef](#)]

8. Armah, G.E.; Sow, S.O.; Breiman, R.F.; Dallas, M.J.; Tapia, M.D.; Feikin, D.R.; Binka, F.N.; Steele, A.D.; Laserson, K.F.; Ansah, N.A.; *et al.* Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-saharan africa: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2010**, *376*, 606–614. [[CrossRef](#)]
9. Madhi, S.A.; Cunliffe, N.A.; Steele, D.; Witte, D.; Kirsten, M.; Louw, C.; Ngwira, B.; Victor, J.C.; Gillard, P.H.; Chevart, B.B.; *et al.* Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in african infants. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 289–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Zaman, K.; Dang, D.A.; Victor, J.C.; Shin, S.; Yunus, M.; Dallas, M.J.; Podder, G.; Vu, D.T.; Le, T.P.; Luby, S.P.; *et al.* Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in asia: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2010**, *376*, 615–623. [[CrossRef](#)]
11. Estes, M.K.; Greenberg, H.B. Rotaviruses and their replication. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.N., Howley, P.M., Eds.; Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 1347–1401.
12. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell* **2009**, *136*, 731–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jackson, R.J.; Hellen, C.U.; Pestova, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 113–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hinnebusch, A.G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 779–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pestova, T.V.; Kolupaeva, V.G.; Lomakin, I.B.; Pilipenko, E.V.; Shatsky, I.N.; Agol, V.I.; Hellen, C.U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7029–7036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Walsh, D.; Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 860–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Poncet, D.; Laurent, S.; Cohen, J. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.* **1994**, *13*, 4165–4173. [[PubMed](#)]
18. Chizhikov, V.; Patton, J.T. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA* **2000**, *6*, 814–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chung, K.T.; McCrae, M.A. Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. *Arch. Virol.* **2011**, *156*, 2197–2203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gratia, M.; Sarot, E.; Vende, P.; Charpilienne, A.; Baron, C.H.; Duarte, M.; Pyronnet, S.; Poncet, D. Rotavirus NSP3 is a translational surrogate of the poly(A) binding protein-poly(A) complex. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8773–8782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gratia, M.; Vende, P.; Charpilienne, A.; Baron, H.C.; Laroche, C.; Sarot, E.; Pyronnet, S.; Duarte, M.; Poncet, D. Challenging the roles of NSP3 and untranslated regions in rotavirus mRNA translation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rubio, R.M.; Mora, S.I.; Romero, P.; Arias, C.F.; Lopez, S. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6336–6345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vende, P.; Piron, M.; Castagne, N.; Poncet, D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* **2000**, *74*, 7064–7071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Deo, R.C.; Groft, C.M.; Rajashankar, K.R.; Burley, S.K. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* **2002**, *108*, 71–81. [[CrossRef](#)]
25. Piron, M.; Delaunay, T.; Grosclaude, J.; Poncet, D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* **1999**, *73*, 5411–5421. [[PubMed](#)]
26. Piron, M.; Vende, P.; Cohen, J.; Poncet, D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **1998**, *17*, 5811–5821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Poncet, D.; Aponte, C.; Cohen, J. Rotavirus protein NSP3 (ns34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J. Virol.* **1993**, *67*, 3159–3165. [[PubMed](#)]
28. Groft, C.M.; Burley, S.K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1273–1283. [[CrossRef](#)]

29. Vitour, D.; Lindenbaum, P.; Vende, P.; Becker, M.M.; Poncet, D. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J. Virol.* **2004**, *78*, 3851–3862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dutta, D.; Chattopadhyay, S.; Bagchi, P.; Halder, U.C.; Nandi, S.; Mukherjee, A.; Kobayashi, N.; Taniguchi, K.; Chawla-Sarkar, M. Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20065–20077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Padilla-Noriega, L.; Paniagua, O.; Guzman-Leon, S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* **2002**, *298*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Michel, Y.M.; Poncet, D.; Piron, M.; Kean, K.M.; Borman, A.M. Cap-poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32268–32276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Montero, H.; Arias, C.F.; Lopez, S. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* **2006**, *80*, 9031–9038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Arnold, M.M.; Brownback, C.S.; Taraporewala, Z.F.; Patton, J.T. Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 1483–1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Harb, M.; Becker, M.M.; Vitour, D.; Baron, C.H.; Vende, P.; Brown, S.C.; Bolte, S.; Arold, S.T.; Poncet, D. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.* **2008**, *82*, 11283–11293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Montero, H.; Rojas, M.; Arias, C.F.; Lopez, S. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **2008**, *82*, 1496–1504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Donnelly, N.; Gorman, A.M.; Gupta, S.; Samali, A. The eIF2alpha kinases: Their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 3493–3511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Proud, C.G. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2005**, *16*, 3–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Rojas, M.; Arias, C.F.; Lopez, S. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 10457–10466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Anderson, P.; Kedersha, N. Stress granules: The tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Reineke, L.C.; Kedersha, N.; Langereis, M.A.; van Kuppeveld, F.J.; Lloyd, R.E. Stress granules regulate double-stranded RNA-dependent protein kinase activation through a complex containing G3BP1 and Caprin1. *mBio* **2015**, *6*, e02486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tsai, W.C.; Lloyd, R.E. Cytoplasmic RNA granules and viral infection. *Annu. Rev. Virol.* **2014**, *1*, 147–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Panas, M.D.; Kedersha, N.; McInerney, G.M. Methods for the characterization of stress granules in virus infected cells. *Methods* **2015**, *90*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. White, J.P.; Lloyd, R.E. Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 175–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Decker, C.J.; Parker, R. P-bodies and stress granules: Possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a012286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Eulalio, A.; Behm-Ansmant, I.; Izaurralde, E. P bodies: At the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lloyd, R.E. How do viruses interact with stress-associated RNA granules? *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kedersha, N.; Stoecklin, G.; Ayodele, M.; Yacono, P.; Lykke-Andersen, J.; Fritzler, M.J.; Scheuner, D.; Kaufman, R.J.; Golan, D.E.; Anderson, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 871–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bhowmick, R.; Mukherjee, A.; Patra, U.; Chawla-Sarkar, M. Rotavirus disrupts cytoplasmic P bodies during infection. *Virus Res.* **2015**, *210*, 344–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Charley, P.A.; Wilusz, J. Sponging of cellular proteins by viral RNAs. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *9*, 14–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bernales, S.; Papa, F.R.; Walter, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 487–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Schroder, M.; Kaufman, R.J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* **2005**, *569*, 29–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **2011**, *334*, 1081–1086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Trujillo-Alonso, V.; Maruri-Avidal, L.; Arias, C.F.; Lopez, S. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12594–12604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zambrano, J.L.; Ettayebi, K.; Maaty, W.S.; Faunce, N.R.; Bothner, B.; Hardy, M.E. Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virol. J.* **2011**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rutkowski, D.T.; Kaufman, R.J. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 20–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).