



Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México

00591 /
241

***Estudio sobre el mecanismo de
penetración de los rotavirus a su célula
huésped***

T E S I S

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias (*Bioquímica*)

PRESENTA

Biol. Mariela Aidé Cuadras Ramírez

Cuernavaca, Morelos

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

259774



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
Bioquímicas

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización del presente trabajo se contó con una beca por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM).

*A Carlos, por ser mi compañero,
por tu comprensión y paciencia
“GRACIAS”.*

A mi bebé, por existir.

A mis padres: Gerardo y Mariela, por sembrar en mí la semilla de la superación.

A mi familia: Gerardo, Elizabeth, Mónica, Julissa, Alfredo, Gerardito, Alex, Julissita, Carlos F. S., Ma. de la Luz H., Elizabeth F., José, Dulce, Manuel y Carlitos: por su apoyo.

Agradecimientos

A Susana y Carlos por ser tutores y amigos.

A todos los del grupo Arias/López por su ayuda y comentarios durante la realización de este trabajo. Rafa, Pedro, Ernesto, Vicky, Fernando E., Georgina, Pavel, Ramón, Luis, Martha, Lolita, Ezequiel, Dixie, C. Guerrero, Miguel Angel, Jimena, Pedro Jr., Selene, Fernando H., Meche, Diana, Rosalba, M. A. Déctor, Nedi, Rocío, Pedrito y algún otro que se me olvide.

A mis amigos: Violeta, Nacho, Francisco, Edith, Poncho, Vicky, Laura P., Betty, Nena, Laura E., Fredi, Maricoyo, Max, Andrea, Laura W., Claudia.
Por los buenos momentos.

Indice

<i>RESUMEN</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	2
<i>INTRODUCCION</i>	4
GENERALIDADES.	5
ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DEL ROTAVIRUS.	7
CICLO REPLICATIVO.	11
PRIMEROS EVENTOS DE LA INFECCION POR ROTAVIRUS.	13
ADSORCION	13
PENETRACION	15
DESENCAPSIDACION	19
PERMEABILIZACION TEMPRANA DE LA MEMBRANA INDUCIDA DURANTE LA INTERACCION DE VIRUS CON SU CELULA HUESPED.	21
SISTEMA DE PSEUDO-PARTICULAS VIRALES.	24
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	26
<i>HIPOTESIS</i>	29
<i>OBJETIVOS</i>	31
<i>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</i>	33
OBTENCION Y PURIFICACION DE VLP'S.	34
<i>RESULTADOS</i>	35
"Rotaviruses Induce an Early Membrane Permeabilization of MA104 Cells and do not Require a Low Intracellular Ca ²⁺ Concentration To Initiate Their Replication Cycle"	36
OBTENCION DE PSEUDOPARTICULAS VIRALES.	47
COENTRADA DE α -SARCINA EN CELULAS MA104 PROMOVIDA POR VLP'S.	50
<i>DISCUSION</i>	56
<i>PERSPECTIVAS</i>	74
<i>REFERENCIAS</i>	77

RESUMEN

En este trabajo estudiamos las interacciones iniciales rotavirus-célula huésped que conducen a una infección productiva, específicamente las relacionadas con la penetración y la desencapsidación de la partícula viral. La estrategia utilizada para el estudio de la penetración fué desarrollar un sistema de penetración de pseudo-partículas virales (VLP's). Las VLP's carecen de genoma viral y medir su penetración por replicación viral es imposible, por lo que montamos y caracterizamos la coentrada de toxinas dependiente de la entrada de rotavirus. Estas toxinas son impermeables a la célula y tienen como blanco la maquinaria de síntesis de proteínas, por lo que su ingreso al citoplasma nos evidencia de manera indirecta la penetración del virus y/o de las VLP's.

Encontramos que la infección con rotavirus induce una permeabilización temprana de la membrana de células MA104 en cultivo y promueve la coentrada de toxinas como α -sarcina. Esta permeabilización requiere de que el virus sea infeccioso y el grado de permeabilización depende de la dosis viral utilizada, siendo 10 partículas infecciosas/célula suficientes para alcanzar el máximo nivel de permeabilización. La coentrada es transitoria y quizás simultánea con la entrada viral; es específica, ya que células poco susceptibles a la infección con rotavirus no son permeabilizadas. La coentrada de toxina mediada por rotavirus no se afectó con inhibidores de endocitosis como dansilcadaverina y citocalasina D; así como tampoco por el tratamiento de las células con bafilomicina A1 (un inhibidor de la ATPasa de protones vacuolar), lo que sugiere que el bajo pH y el gradiente de protones dentro de los endosomas no se requieren para la permeabilización.

Respecto a desencapsidación encontramos que el uso de ionóforos de calcio y tapsigargina que incrementan la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) por dos mecanismos diferentes, no afectó la coentrada de α -sarcina ni la síntesis de proteínas virales, lo que sugiere que la baja $[Ca^{2+}]_i$ no es esencial para los primeros eventos de la infección.

Finalmente encontramos que VLP's de composición protéica completa (VP2/VP6/VP7/VP4) inducen la coentrada de toxina de manera dosis dependiente y que esta permeabilización requiere de la presencia de la proteína VP4 ensamblada en la pseudo-partícula viral. Sin embargo, la coentrada de α -sarcina no depende del corte proteolítico de las VLP's con tripsina ni fué inhibida con anticuerpos neutralizantes ó por el tratamiento de las

células con neuraminidasa, lo que sugiere un cambio conformacional en las proteínas estructurales de rotavirus ensambladas en el sistema de VLP's .

ABSTRACT

In this work we studied the rotavirus-host cell early interactions that lead to a productive infection, specifically those related to penetration and uncoating of viral particle.

To study virus entry we developed an assay to measure the penetration of virus like particles (VLP's). Because VLP's lack viral genome measurement of their penetration by viral replication is imposible. To circumvent this difficulty we have characterized the rotavirus-induced coentry of toxins. These toxins are non-cell permeable, and since they have the translation machinery as a molecular target, their presence in cytoplasm indirectly indicates viral or VLP penetration.

We found that rotavirus infection induces an early membrane permeabilization of MA104 cells in culture and promotes the coentry of toxins such as a-sarcin. This cell permeability was shown to depend on infectious virus and was also shown to be virus dose dependent with 10 infectious particles per cell being sufficient to achieve maximum permeability. The coentry is transient maybe simultaneous with virus entry, and specific since cells that are poorly permissive for rotavirus were not permeabilized. The rotavirus-mediated coentry of toxin was not blocked by the endocytosis inhibitors dansylcadaverine and cytochalasin D or by the vacuolar proton-ATPase inhibitor bafilomycin A1, suggesting that neither acidic pH or a proton gradient across endosomes is required for permeabilization of the cells.

In respect to uncoating we found that calcium ionophores and thapsigargin, compounds that raise the intracellular concentration of calcium ($[Ca^{2+}]_i$) by different mechanisms, did not block the coentry of a-sarcin nor affect the onset of viral protein synthesis, suggesting that a low $[Ca^{2+}]_i$ is not essential for the initial steps of the virus life cycle.

Finally we found that complete VLP's (protein composition VP2/VP6/VP7/VP4) promote the coentry of toxin in a dose dependent manner, and this cell permeabilization requires assembled VP4 protein in the VLP. However, α -sarcin coentry does not seem to depend on the trypsin treatment of VLP's nor was inhibited by viral neutralizaing antibodies

células con neuraminidasa, lo que sugiere un cambio conformacional en las proteínas estructurales de rotavirus ensambladas en el sistema de VLP's .

ABSTRACT

In this work we studied the rotavirus-host cell early interactions that lead to a productive infection, specifically those related to penetration and uncoating of viral particle.

To study virus entry we developed an assay to measure the penetration of virus like particles (VLP's). Because VLP's lack viral genome measurement of their penetration by viral replication is imposible. To circumvent this difficulty we have characterized the rotavirus-induced coentry of toxins. These toxins are non-cell permeable, and since they have the translation machinery as a molecular target, their presence in cytoplasm indirectly indicates viral or VLP penetration.

We found that rotavirus infection induces an early membrane permeabilization of MA104 cells in culture and promotes the coentry of toxins such as α -sarcin. This cell permeability was shown to depend on infectious virus and was also shown to be virus dose dependent with 10 infectious particles per cell being sufficient to achieve maximum permeability. The coentry is transient maybe simultaneous with virus entry, and specific since cells that are poorly permissive for rotavirus were not permeabilized. The rotavirus-mediated coentry of toxin was not blocked by the endocytosis inhibitors dansylcadaverine and cytochalasin D or by the vacuolar proton-ATPase inhibitor bafilomycin A1, suggesting that neither acidic pH or a proton gradient across endosomes is required for permeabilization of the cells.

In respect to uncoating we found that calcium ionophores and thapsigargin, compounds that raise the intracellular concentration of calcium ($[Ca^{2+}]_i$) by different mechanisms, did not block the coentry of α -sarcin nor affect the onset of viral protein synthesis, suggesting that a low $[Ca^{2+}]_i$ is not essential for the initial steps of the virus life cycle.

Finally we found that complete VLP's (protein composition VP2/VP6/VP7/VP4) promote the coentry of toxin in a dose dependent manner, and this cell permeabilization requires assembled VP4 protein in the VLP. However, α -sarcin coentry does not seem to depend on the trypsin treatment of VLP's nor was inhibited by viral neutralizing antibodies

or by the treatment of cells with neuraminidase. This result suggests that rotavirus structural proteins have undergone a conformational change when assembled in the VLP's system.

INTRODUCCION

GENERALIDADES.

Hace 25 años Bishop y colaboradores descubrieron los rotavirus humanos mediante microscopía electrónica de biopsias duodenales de niños con diarrea deshidratante severa, desde entonces, estos virus han sido reconocidos como el principal agente etiológico de gastroenteritis viral infantil y de crías de animales de importancia económica para el hombre. Estudios de campo en más de 50 países han demostrado que estos virus son la causa del 35-70% de las hospitalizaciones por diarrea severa, y llegan a ocasionar cerca de 870,000 muertes por año en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo (Glass *et al.*, 1996, Kapikian & Chanock, 1996).

La vía de infección de rotavirus es principalmente por la ruta oral-fecal y es altamente contagiosa. Pese a los esfuerzos por prevenir la enfermedad implementando medidas de sanitización del agua, se estima que en países desarrollados y en los subdesarrollados la mayoría de los niños de 3 a 5 años de edad han sido infectados por rotavirus (Glass *et al.*, 1996); de aquí la importancia del entendimiento de la biología molecular e inmunología de estos virus que permitan desarrollar mecanismos de protección efectiva que prevenga la infección.

Estos virus comprenden un género dentro de la familia *Reoviridae*, son virus de simetría icosaédrica de 76 nm de diámetro; estructuralmente carecen de membrana lipídica y están compuestos por tres capas concéntricas de proteínas y un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (fig. 1) (Estes, 1996).

Microscópicamente, se pueden encontrar tres tipos de partículas: De triple capa, doble capa y nucleocápsides ó "cores"; cuyos diámetros varían de 76 a 50 nm. *In vitro*, las partículas de doble capa y "cores" se producen por disrupción química y se desconoce si estas partículas son idénticas a las partículas subvirales intermediarias que se sintetizan durante la replicación viral (Estes & Cohen, 1989).

Los 11 segmentos de RNA están contenidos dentro de la nucleocápside viral. El tamaño de los genes varía de 667 a 3,302 pares de bases (pb), que en su conjunto constituyen un genoma de aproximadamente 18,500 pb (Estes & Cohen, 1989, Patton, 1995).

Cada segmento de RNA inicia con una secuencia conservada en el extremo 5' que forma parte de una región no traducida, seguida de ésta se encuentra el marco de lectura

abierto que codifica para el producto proteínico y posteriormente otra secuencia 3' terminal no traducida y conservada, que carece de señales de poliadenilación. La longitud de las secuencias 5' y 3' no traducidas varía entre los genes pero es conservada para cada gen entre las distintas cepas (Patton, 1995). La función de las secuencias no traducidas se desconoce, sin embargo, dado que forman estructuras secundarias se cree que son el sitio de unión de las proteínas virales que interaccionan con el RNA durante la transcripción, replicación y empaquetamiento del genoma (Patton, 1995).

En general la secuencia nucleotídica de los genes es rica en A-T (58-67%) y la mayoría de éstos codifican para un solo marco abierto de lectura. El primer codón de inicio de la traducción mantiene las características del consenso de Kozak (Kozak, 1981). La hebra positiva de cada RNA genómico contiene la secuencia nucleotídica m⁷GpppG^(m)GPY de tal manera que se produce un RNA mensajero (RNAm) con la estructura CAP en el extremo 5' (Estes & Cohen, 1989).

La replicación de los rotavirus involucra la formación de tres tipos distintos de partículas subvirales intermediarias de replicación (RI's, replication intermediates). La menor de ellas se denomina "precore-RI" y contiene las proteínas de la cápside VP1 y VP3; así como las proteínas no estructurales NSP1, NSP2 y NSP3. El segundo intermediario es el "core-RI", en el que disminuyen los niveles de NSP3 y se añaden el genoma viral y las proteínas VP2 y NSP5. El empaquetamiento del genoma viral dentro de la cápside, requiere de interacciones íntimas proteína-RNA. Por la longitud del genoma y el tamaño de la cápside, se cree que las proteínas dan flexibilidad a las moléculas de RNA de tal manera que puedan ser acomodadas dentro de la misma. La maduración del "core-RI" a "VP6-RI" es dirigida por la afinidad entre VP6 y VP2. Finalmente las proteínas no estructurales salen del complejo y se obtiene una partícula de doble cápside, esta partícula probablemente une la VP4 soluble en citoplasma y luego interacciona con NSP4 que se localiza junto con VP7 en el retículo endoplásmico de la célula infectada (Patton, 1995).

Las propiedades específicas de cada una de las proteínas no estructurales no se conocen con precisión, sin embargo algunas características como su carga positiva, la capacidad de unir RNA y su presencia restringida a partículas subvirales con actividad replicasa, sugieren que estas proteínas funcionan como parte del complejo de replicación, ya sea como chaperonas para el transporte de RNA, y/o de las proteínas al sitio de replicación ó

ensamblaje; ó como reclutadoras de los RNA's genómicos durante el empaquetamiento de la partícula viral (Estes, 1996).

ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DEL ROTAVIRUS.

Las tres capas de proteínas que dan estructura a los rotavirus son: nucleocápside ó "core", capa intermedia y capa externa (Fig. 1).

La nucleocápside está formada mayoritariamente por 60 dímeros de la proteína estructural VP2 y 12 moléculas de cada una de las proteínas VP1 y VP3. Existen evidencias que sugieren que todas las proteínas de la nucleocápside están ligadas a la función de RNA polimerasa viral (Estes & Cohen, 1989).

VP2 es una proteína de 94 kDa, capaz de unir RNA y su presencia es esencial para la función de replicasa. VP1 parece no tener función estructural dada su baja proporción en la masa viral, sin embargo comparte secuencias consenso con las distintas RNA polimerasas dependientes de RNA, lo que hace suponer que ésta proteína funciona como la RNA polimerasa viral. A VP3 se le atribuye la función de guaniltransferasa dada su capacidad de unir α -³²P-GTP (Estes, 1996).

La capa intermedia de rotavirus está formada por 260 trímeros de VP6; ésta proteína es la más abundante en el virión y constituye aproximadamente el 51 % de la masa viral. Tiene un peso molecular de 44 kDa y es hidrofóbica; además, VP6 desempeña un papel importante en la estructura del virión dado que interacciona con las proteínas de capa externa y con la VP2, en la nucleocápside. Además esta proteína comparte epítopes conservados entre las diferentes cepas de rotavirus, por lo que generalmente es la proteína blanco en ensayos de diagnóstico (Estes, 1996, Estes & Cohen, 1989).

La capa externa del virión está constituida por las proteínas VP7 y VP4. VP7 forma la superficie lisa del virión de la que se proyectan 60 dímeros de VP4 en forma de espículas. VP7 es una glicoproteína de 37 kDa, es la segunda proteína estructural más abundante (~780 copias por virus), es altamente inmunogénica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Estes & Cohen, 1989).

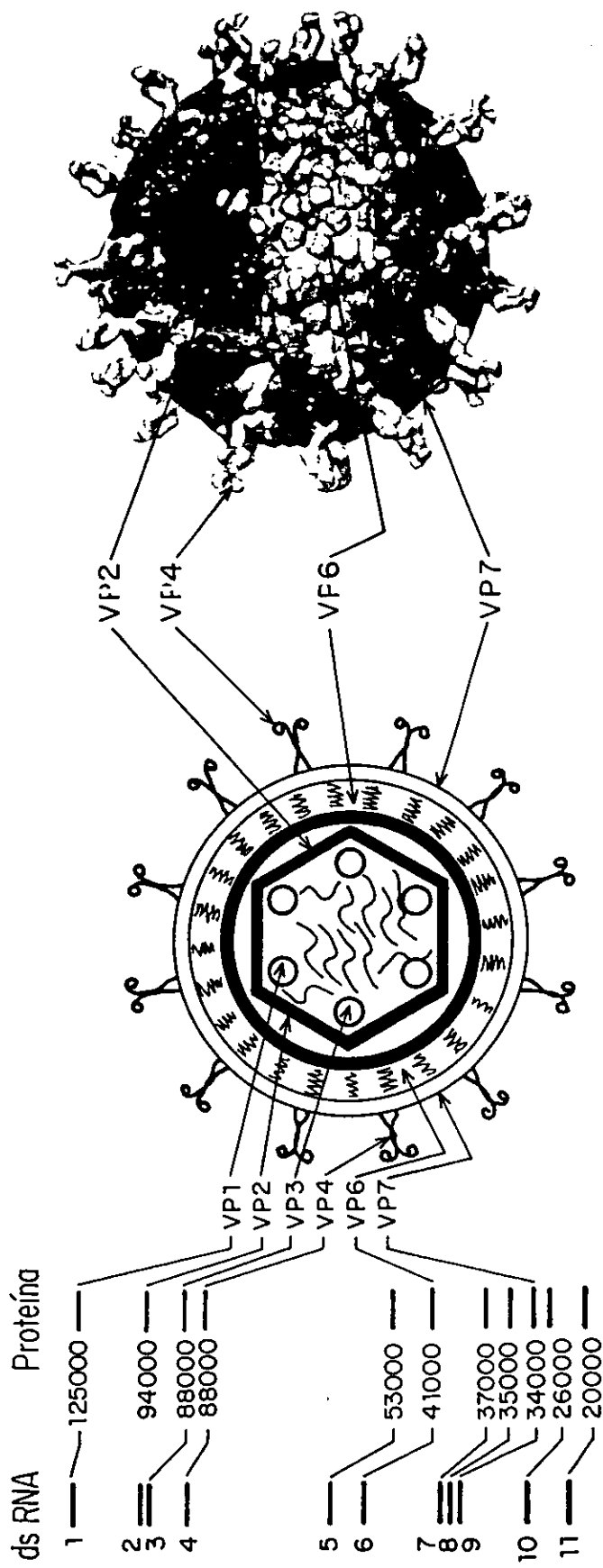


Figura 1. Representación esquemática del rotavirus. Se muestra la estructura tridimensional de las partículas virales determinada por criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes. Se indican las proteínas estructurales codificadas por su respectivo segmento del genoma.

VP4 es una proteína no glicosilada de 88 kDa, es inmunogénica, e induce inmunidad protectora en ratones. A VP4 se le atribuyen distintas funciones biológicas como la especificidad de huésped, la interacción inicial virus-célula y la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos (hemaglutinación, HA) (Estes & Cohen, 1989).

La infectividad de los rotavirus se incrementa y depende del tratamiento del virus con tripsina. La tripsina corta a VP4 específicamente en dos polipéptidos, VP8 (28KDa) y VP5 (60 KDa), que representan los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína, respectivamente (fig. 2) (Espejo *et al.*, 1981, Estes *et al.*, 1981). Se sabe que la unión del virus a la célula es independiente del tratamiento del virus con tripsina (Clark *et al.*, 1981, Fukuhara *et al.*, 1988, Kaljot *et al.*, 1988), por lo que se ha especulado que el corte proteolítico desencadena un paso posterior en el ciclo replicativo del rotavirus (presumiblemente la penetración), que debe ser disparado ya sea por los extremos recién generados por el corte, ó por un posible cambio conformacional en VP4 que ocurre como consecuencia del corte proteolítico (López *et al.*, 1985). Al respecto, cabe mencionar que por estudios de criomicroscopía electrónica no se han detectado cambios significativos en la estructura de la VP4 cortada ó no con tripsina (Raming *et al.*, 1993).

La diversidad de estudios bioquímicos con VP4 y la comparación de las secuencias reportadas hasta la fecha han permitido ubicar distintos dominios funcionales dentro de esta proteína (fig. 2) como son:

i) El sitio de corte con tripsina. La determinación de la estructura primaria del sitio de corte mediante degradación secuencial de Edman, evidenció que VP4 se corta en tres residuos de arginina totalmente conservados entre las distintas cepas de rotavirus en las posiciones 231, 241 y 247 (Arias *et al.*, 1996, López *et al.*, 1985).

ii) El dominio de HA. La construcción de genes quiméricos de VP4 entre cepas hemaglutinantes y no hemaglutinantes de rotavirus y su expresión en el sistema de baculovirus, evidenció que el dominio de HA se ubica entre los aa 93-208 (dentro de VP8) (Fuentes Panana *et al.*, 1995).

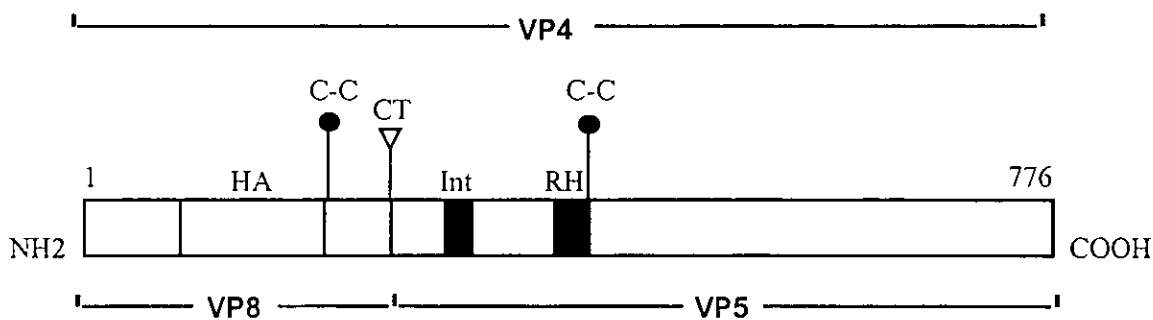
iii) La delimitación de VP8 como la región responsable de la interacción con residuos de ácido siálico (AS) en la membrana celular. La caracterización más específica del dominio de unión a AS en VP8, por mutagénesis dirigida y su expresión en bacterias como proteína de fusión a GST, demostró que los residuos Tyr-155, Tyr-188 y Ser-190 son esenciales para la

actividad de unión a ácido siálico en la proteína VP8 del rotavirus de simio RRV (Isa *et al.*, 1997).

iv) La identificación de una región hidrofóbica entre los aminoácidos 384-401 dentro de VP5, que presenta un 45% de identidad con una región importante para la fusión de los alfavirus (Sindbis y Semliki), por lo que se ha especulado que ésta podría tener una función similar en rotavirus (Mackow *et al.*, 1988).

v) La formación de dos puentes disulfuro intramoleculares entre los residuos de cisteína altamente conservados en las posiciones 203-216 y 318-380, de algunas cepas de rotavirus que infectan animales (Patton *et al.*, 1993).

vi) La reciente descripción de que la proteína VP4 contiene la secuencia DGE (aa 307-309) que sirve para unir integrinas del tipo $\alpha 2 \beta 1$ y el bioqueo de la infección por la preincubación del virus con péptidos sintéticos que contienen estas secuencias ó la de las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra éstas integrinas, sugiere que éstas moléculas participan activamente en la adsorción ó penetración del virus a su célula huésped (Coulson *et al.*, 1997).



HA = dominio de hemaglutinación	aa 98-203
C-C= puentes disulfuro	Cys 203-216, 318-380
CT = sitio de corte con tripsina	Arg 231,241,247
Int = ligando de integrinas	aa 307-309
RH= región hidrofóbica	aa 384-401

Figura 2. Representación esquemática de VP4. Se muestran los polipéptidos VP8 y VP5, así como los sitios de corte con tripsina que los originan. Se indican los dominios más relevantes: hemaglutinación, región hidrofóbica, secuencia de reconocimiento a integrinas. La posición de los puentes disulfuro también se indica.

Las proteínas VP4 y VP7 interactúan íntimamente en la superficie del virión maduro y se ha demostrado que ésta interacción afecta la expresión de ciertos fenotipos y las propiedades antigénicas de las proteínas. El análisis de rotavirus rearreglantes cuyas proteínas de capa externa provienen de cepas parentales diferentes han mostrado que la reactividad de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP8 y VP5 puede aumentar ó disminuir dependiendo del origen de la VP7 acompañante (Chen *et al.*, 1992). Adicionalmente se ha reportado que la expresión de ciertos fenotipos como son el tamaño de placa, la capacidad de formar placas en ausencia de tripsina, y los títulos altos de replicación viral son afectados por el fondo genético de los arreglos y dependen del origen de ambas proteínas de capa externa para su expresión (Chen *et al.*, 1989, Xu & Woode, 1994). Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que la especificidad de unión al receptor, fenotipo modulado por VP4, se ve influenciada por el origen de la VP7 seleccionada (Méndez *et al.*, 1996).

CICLO REPLICATIVO.

La infección por rotavirus se inicia mediante la interacción de alguna (s) de las proteínas de capa externa, con el (los) receptor (es) de la membrana celular.

Cuando el virus ha sido internalizado, inicia la transcripción del genoma viral, que involucra la síntesis del RNAm que puede ser utilizado tanto para la síntesis de proteínas, ó como templado para sintetizar la hebra complementaria durante la replicación del genoma. La transcripción y morfogénesis de las partículas subvirales ocurre en regiones electrodensas del citoplasma denominadas viroplasma, que son zonas ricas en proteínas virales y que se localizan en la periferia del retículo endoplásmico (RE). Una vez ensambladas en el viroplasma, las partículas subvirales que contienen dos de las tres capas proteínicas geman hacia el lumen del RE. La proteína no estructural NSP4 funciona como receptor de las partículas subvirales sobre la membrana del RE. En el proceso de gemación, el virus adquiere una membrana lipídica transitoria, que se pierde conforme las partículas migran dentro del RE y es remplazada por una capa de proteínas (VP7 y VP4) que conformarán la capa externa del virión. Finalmente las partículas virales maduras son liberadas por lisis celular (Fig. 3) (Estes, 1996).

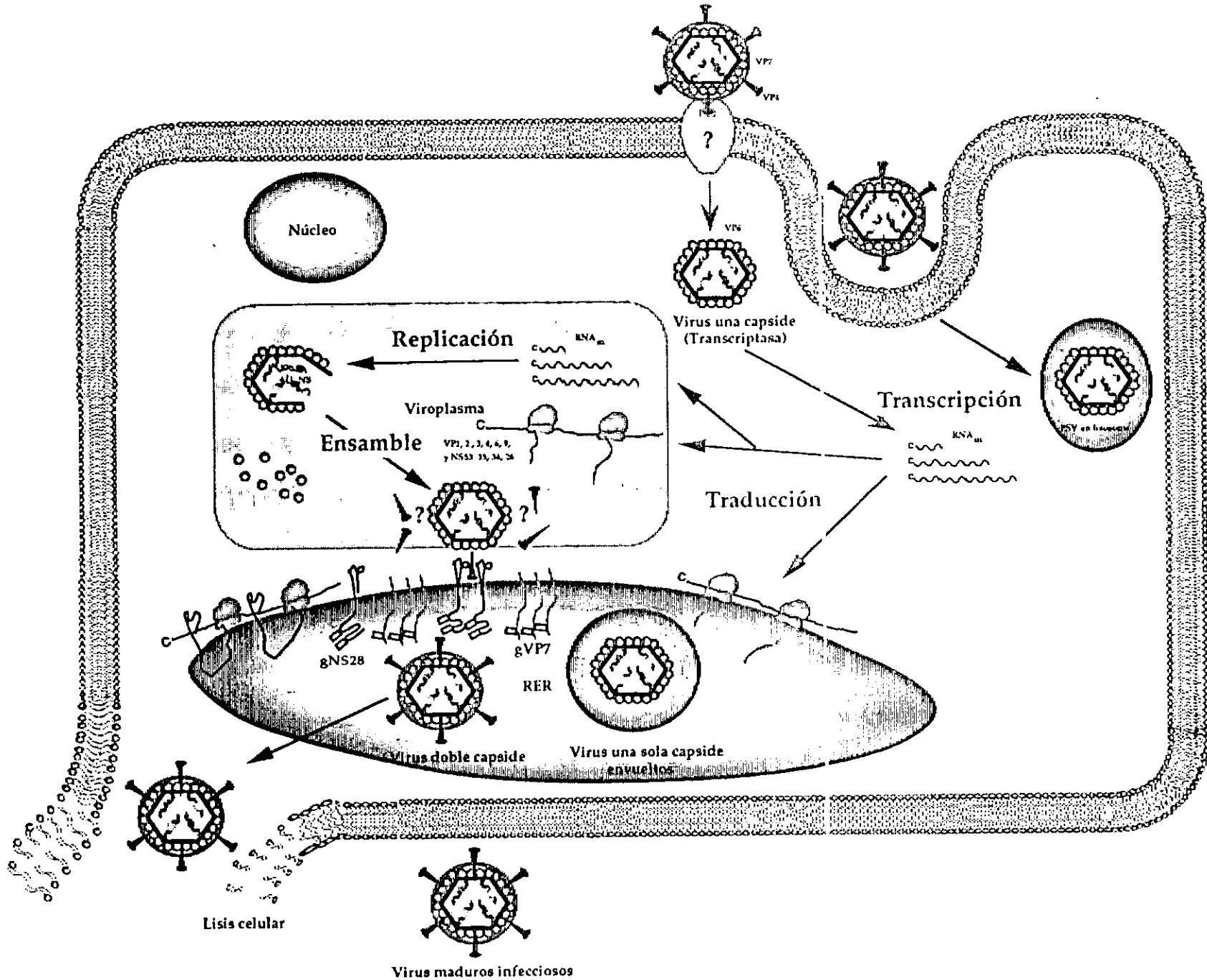


Figura 3. Principales características del ciclo de replicación de rotavirus

PRIMEROS EVENTOS DE LA INFECCION POR ROTAVIRUS.

Se considera que las primeras interacciones del virus con su célula huésped involucran la adsorción y penetración a través de una ó varias moléculas receptoras; así como la desencapsidación de la partícula viral, con la subsecuente liberación de la partícula transcripcionalmente activa.

In vivo, los rotavirus tienen un tropismo celular sumamente específico; la replicación viral solo se lleva a cabo en los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado (Estes & Cohen, 1989). En estudios sistemáticos del ciclo replicativo viral en líneas celulares que difieren en la susceptibilidad a la infección por rotavirus, Bass y colaboradores demostraron que la adsorción, el ensamble y la liberación de partículas, no son el principal determinante en la susceptibilidad a la infección, ya que las diferentes líneas celulares no susceptibles fueron capaces de unir virus y sostener una replicación viral tan eficientemente como las células permisivas (Bass *et al.*, 1992). Sus resultados demostraron que la penetración a través de la membrana es el paso limitante de la infección, y que las líneas celulares no permisivas poseen las moléculas de superficie responsables de la unión de rotavirus pero que son incapaces de mediar eficientemente su penetración al compartimento citoplásmico donde se inicia la transcripción. Este bloqueo quizás se deba a que estas células carecen de la molécula celular responsable de la internalización del virus.

ADSORCION

El primer evento de un ciclo infectivo viral involucra la interacción específica entre una proteína del virión, a la que se le denomina proteína de adsorción viral, y un constituyente de la superficie celular que funciona como su receptor. A ésta interacción se le conoce como adsorción del virus a su célula huésped. Las proteínas virales de adsorción pueden ser las proteínas que forman la capa externa de los virus no envueltos ó las proteínas de la membrana viral en los virus envueltos. Esta interacción es muy específica para cada sistema virus-célula, y puede llegar a alterarse por cambios en la proteína viral y en la molécula receptora.

En muchos sistemas virales está claro que se requiere el reconocimiento de más de un receptor para la interacción virus-célula huésped; en un gran número de familias virales como herpes simplex, adenovirus y HIV, se ha observado que la unión inicial es promiscua y permite una asociación rápida del virus con la célula; la siguiente interacción es más

específica (probablemente es la que determina el tropismo del virus) y conduce a la internalización del virión (Haywood, 1994). Por otra parte, múltiples receptores celulares pueden actuar simultáneamente para modularse uno al otro ó complementarse en función; alternativamente los receptores pueden actuar secuencialmente, es decir la unión al primero puede causar cambios conformacionales en el virus (ó en la célula) de tal manera que se expongan regiones necesarias para que se reconozca el segundo receptor (Haywood, 1994).

En rotavirus, existen datos contradictorios acerca de las proteínas virales que intervienen en el proceso de adsorción; las dos proteínas de capa externa VP4 y VP7, han sido involucradas en este evento (Bass *et al.*, 1991, Fukudome *et al.*, 1989, Fukuhara *et al.*, 1988). Sin embargo, los resultados más recientes favorecen a VP4 como la proteína viral responsable de la adsorción del virus. Por parte de la célula, se sabe que la adsorción inicial de los rotavirus que infectan animales, es mediada por residuos de ácido siálico en la membrana celular, ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa (enzima que remueve el ácido siálico de la membrana) ó la preincubación de los virus con glicoforina A (glicoproteína con alto contenido de residuos de ácido siálico) inhiben la adsorción e infección de estos virus (Fukudome *et al.*, 1989, Keljo & Smith, 1988, Yolken *et al.*, 1987). Por el contrario las cepas de rotavirus que infectan humanos no requieren de la interacción con ácido siálico para infectar (Fukudome *et al.*, 1989).

Recientemente en nuestro laboratorio se aislaron mutantes de rotavirus de origen animal, que son capaces de infectar células tratadas con neuraminidasa (Méndez *et al.*, 1993). El aislamiento de éstas mutantes permitió demostrar que la unión a ácido siálico no representa un paso esencial en la infección de células epiteliales en cultivo por cepas de rotavirus de origen animal, además de evidenciar una nueva interacción rotavirus-célula huésped independiente de ácido siálico que podría ser la responsable de la penetración del virus hacia el citoplasma celular. Estudios funcionales con éstas mutantes han permitido establecer que quizás el extremo carboxilo terminal de VP4, es decir VP5 sea la proteína viral responsable de la interacción ácido-siálico independiente.

Recientemente se reportó que VP4 y VP7 interactúan con distintas integrinas durante la infección; ambas proteínas contienen secuencias de tripéptidos que sirven de sitios de reconocimiento a integrinas. Al parecer la interacción de VP4 con éstos ligandos es la más significativa durante la infección ya que en condiciones de bloqueo de la infectividad (en las

que se realizó una preincubación de las células con péptidos sintéticos que mimetizan las secuencias de unión a integrinas ó anticuerpos monoclonales anti-integrinas) ésta se disminuyó en un 90% con respecto al experimento control. Sin embargo, dado que los péptidos con las secuencias de VP7 inhiben en un 50% la infectividad, no podemos descartar el papel de ésta proteína en el proceso de unión a la célula (Coulson *et al.*, 1997).

PENETRACION

En una infección viral el paso siguiente a la adsorción es la entrada del virus hacia el citoplasma celular ó penetración. Existen por lo menos tres mecanismos diferentes descritos hasta la fecha, por los cuales un virus puede atravesar la membrana de una célula susceptible a la infección (figura 4). a) Penetración directa a través de la membrana plasmática b) Endocitosis mediada por receptor y, c) fusión directa con la membrana plasmática (Carrasco *et al.*, 1989). Cuál de éstos mecanismos va a ser utilizado por un virus, parece ser muy particular y depender de la biología de cada sistema viral. Por ejemplo, los virus provistos de cubierta lipídica generalmente fusionan su envoltura con alguna membrana celular (plasmática ó endosomal); mientras que los virus que carecen de envoltura lipídica, en teoría podrían atravesar la membrana plasmática directamente después de su interacción con el receptor.

a) **Penetración directa.** Es difícil imaginarse como una partícula viral puede atravesar directamente la membrana; sin embargo, para virus desprovistos de cubierta lipídica existe un momento durante su penetración en el que el genoma viral cruza la membrana y se libera al citoplasma. La penetración directa a través de la membrana se ha descrito para algunos virus como adenovirus, poliovirus y las partículas subvirales intermediarias (ISVS's) de reovirus (Carrasco *et al.*, 1989). Cuando los viriones completos de reovirus son procesados proteolíticamente se convierten en ISVP's y se obtiene un incremento notable en su infectividad. Se especula que las ISVP's atraviesan la membrana mediante un mecanismo que involucra la formación de poros (Joklik, 1983). Recientemente se reportó que únicamente estas partículas, a diferencia de los viriones intactos, son capaces de inducir la formación de canales permeables a aniones cuando se añaden a bicapas lipídicas (Tosteson *et al.*, 1993). El mecanismo molecular de penetración directa se desconoce aún, sin embargo, se continúan haciendo estudios bioquímicos y fisiológicos que ayuden a esclarecerlo.

b) Endocitosis mediada por receptor. Muchas macromoléculas como hormonas y lectinas son internalizadas por endocitosis. El mecanismo preciso de endocitosis, se dispara por la adsorción del ligando a un receptor celular, seguido del agrupamiento de los receptores en la superficie celular, proceso mediado por la proteína citoplásmica clatrina. Este agrupamiento de receptores-ligandos lleva a la formación de vesículas endocíticas que migran por el citoplasma hasta su encuentro con lisosomas (Marsh & Pelchen-Matthews, 1994).

La endocitosis es un componente esencial de las estrategias virales utilizadas para penetrar. Por ejemplo para el virus de la influenza, el ambiente ácido de los endosomas induce cambios conformacionales en la glicoproteína viral (HA) que son necesarios para fusionar la membrana viral con la vesícula endosomal y liberar el genoma al interior de la célula (Carrasco *et al.*, 1989, Marsh & Pelchen-Matthews, 1994).

c) Fusión directa. La fusión de membranas es una actividad frecuente en distintos eventos celulares como endocitosis y exocitosis. Algunos virus provistos de cubierta lipídica fusionan su envoltura con la membrana plasmática para penetrar. Este proceso es no disruptivo y representa un mecanismo eficiente para internalizar el genoma al citoplasma celular. La actividad de fusión en éstos virus es catalizada por glicoproteínas virales. Las proteínas virales de fusión identificadas hasta la fecha, son glicoproteínas homo ó heterooligoméricas, son transmembranales y su extremo amino terminal está orientado extramembranalmente. Los precursores de las glicoproteínas se procesan proteolíticamente y se producen cambios conformacionales que desenmascaran la región hidrofóbica responsable de interaccionar con la membrana blanco (Marsh & Helenius, 1989). Los virus Sendai utilizan éste mecanismo para penetrar, la glicoproteína fusogénica F_0 es procesada a F_1 y F_2 . El pH óptimo de esta fusión es de aproximadamente 9 y contrario a la fusión que ha sido observada en endosomas, los ambientes con pH ácido inhiben completamente el proceso (White, 1992).

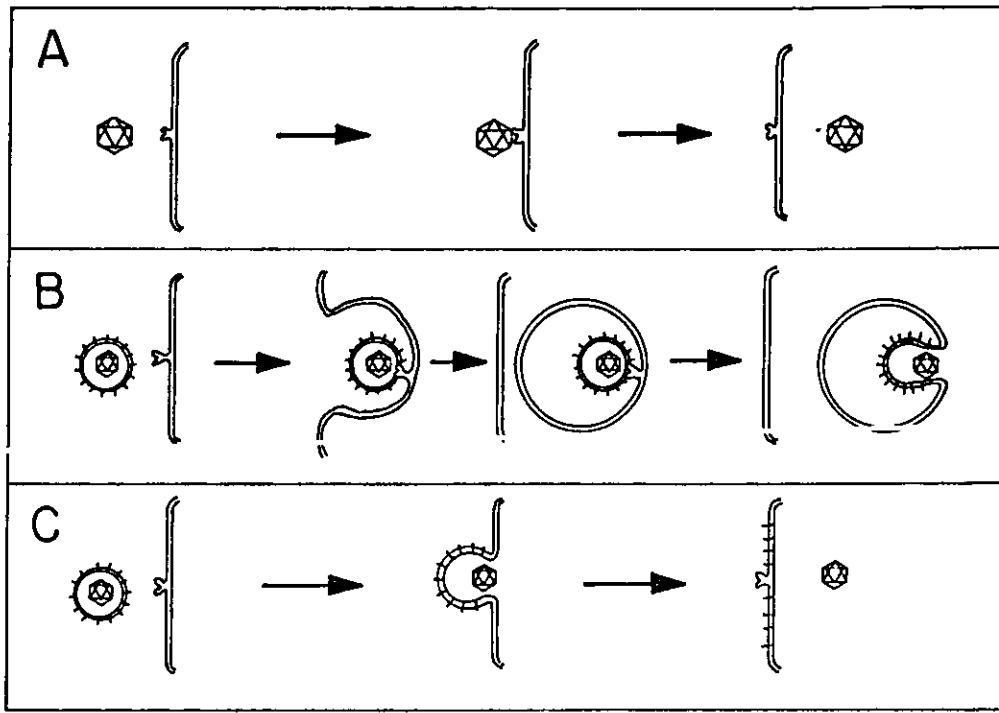


Figura 4. Mecanismos de entrada viral. A) Penetración directa a través de la membrana plasmática. B) Endocitosis mediada por receptor. C) Fusión directa.

La penetración de los rotavirus a la célula huésped, al igual que en otros sistemas virales como el virus de Herpes, parece ser el resultado de varios pasos que involucran la interacción de VP4 y quizás de VP7 con diferentes moléculas de la superficie celular. Sin embargo, hasta ahora no se ha esclarecido el mecanismo molecular que conduce al ingreso del virus al interior celular. Se sabe que el corte de VP4 con tripsina es dispensable para la unión del virus a la célula, pero necesario para la penetración (Fukuhara *et al.*, 1988, Kaljot *et al.*, 1988).

Se ha propuesto que el corte de VP4 con tripsina expone nuevos sitios de la proteína que son capaces de interactuar específicamente con la membrana celular, sin embargo esto no ha sido demostrado directamente. Los cambios conformacionales que ocurren en VP4 por la activación proteolítica con tripsina se desconocen. Se ha observado que éste corte altera las propiedades hidrofóbicas del virión aumentando su capacidad de interacción con liposomas y vesículas de membrana (Nandi *et al.*, 1992, Ruiz *et al.*, 1994). Se ha especulado que la región hidrofóbica de VP5 (aa 384-401), que es homóloga al péptido de fusión de los alfavirus, podría participar de manera específica y ser responsable de ésta interacción (Ruiz *et al.*, 1994). Así mismo, existen trabajos que proponen a VP7 como la proteína responsable de éste aumento de hidrofobicidad, ya que VP7 ensamblada en pseudo-partículas virales (VLP's) y tratada con tripsina después de ser solubilizada con EGTA, induce la liberación de carboxifluoresceína en vesículas de membrana (Charpilienne *et al.*, 1997).

Estudios ultraestructurales de microscopía electrónica, muestran evidencias que apoyan dos mecanismos distintos de penetración en rotavirus: 1) Endocitosis mediada por receptor, apoyada por la observación de partículas virales en "coated pits" y endosomas secundarios (Ludert *et al.*, 1987, Quan & Doane, 1983); y 2) Penetración directa, ésta última sustentada en la observación de que los rotavirus tratados con tripsina se encuentran en el citoplasma fuera de vesículas endosómicas y desprovistos de capa externa, mientras que los virus no cortados se observan en el interior de vesículas fagocíticas y lisosomas tardíos (Suzuki *et al.*, 1985, Suzuki *et al.*, 1986).

Los estudios funcionales con bases débiles e ionóforos carboxílicos que neutralizan el pH endosomal (Bass *et al.*, 1995, Fukuhara *et al.*, 1987, Kaljot *et al.*, 1988, Ludert *et al.*, 1987), no inhiben significativamente la replicación de los rotavirus. Además, el tratamiento de las células con colchicina y citocalasina D que inhiben la ruta endocítica por

despolimerización de proteínas del citoesqueleto (tubulina y actina) y el bloqueo del agrupamiento de moléculas de clatrina por dansilcadaverina, no disminuye la infección por rotavirus (Bass *et al.*, 1995). Contrariamente, cuando las células poco susceptibles a la infección (células L) se tratan con citocalasina D y dansilcadaverina, aumentan notablemente su permisividad a la infección, lo que sugiere de que en éstas células, el virus puede estar siendo secuestrado intracelularmente en las vesículas endocíticas (Bass *et al.*, 1995).

Por otra parte, Fukuhara y colaboradores demostraron que el modo de internalización de los virus cortados y sin cortar con tripsina es totalmente distinto. Por medio de ensayos de escape a la digestión de proteasas externas, encontraron que en los virus activados con tripsina las proteínas de capa externa se quedan afuera de la célula y, únicamente son internalizadas partículas de doble capa: mientras que en virus sin cortar con tripsina ó neutralizados con anticuerpos monoclonales anti-VP4 y VP7, también los componentes de la capa externa se internalizaban (Fukuhara *et al.*, 1988).

Kaljot y colaboradores por medio de cinéticas de penetración propusieron un mecanismo que aparentemente concilia las observaciones microscópicas y los estudios funcionales. Estos investigadores encontraron que los virus activados con tripsina tienen un tiempo medio ($t_{1/2}$) de internalización de 3 a 5 min. y además son infecciosos; los virus sin activar con tripsina desaparecen de la membrana celular con un $t_{1/2}$ de internalización de 30 a 50 min. y no producen infección alguna (Kaljot *et al.*, 1988).

En base a todos éstos resultados se ha propuesto una hipótesis para explicar el mecanismo a través del cual ocurre la penetración viral en rotavirus. Esta hipótesis propone que los rotavirus cortados con tripsina son infecciosos y penetran rápidamente por la vía directa; mientras que virus sin cortar penetran por la vía endocítica y no conducen a una infección productiva (Kaljot *et al.*, 1988, Suzuki *et al.*, 1985, Suzuki *et al.*, 1986).

DESENCAPSIDACION

Antes de que el genoma del virus entrante pueda ser replicado en la célula huésped, la partícula viral tiene que desencapsidarse. La desencapsidación ó desnudamiento, involucra la pérdida de las envolturas lipídica ó proteínica que fueron ensambladas durante la morfogénesis viral, para liberar el genoma viral al citoplasma ó núcleo celular y dar inicio a la transcripción y replicación del material genético del virus (Greber *et al.*, 1994).

Se han propuesto tres mecanismos para explicar los cambios dramáticos que sufre la cápside viral durante el desnudamiento, considerando que éste ocurre en el mismo ambiente celular en el que el virión fué ensamblado.

1. La partícula viral puede ser modificada estructuralmente después de su liberación de la célula, de tal manera que está “preparada” para que al interactuar con ó ingresar a una nueva célula huésped encuentre el ambiente propicio para desensamblarse. Los factores que causan dichos cambios incluyen: ya sea, la unión con el receptor ó la exposición del virus a un pH bajo en el ambiente intra-endosomal. Sin embargo, condiciones reductoras, bajas concentraciones de calcio e interacciones con receptores citosólicos también son señales que han sido implicadas con el desnudamiento viral. De hecho, estudios con adenovirus, rinovirus, influenza y reovirus han mostrado que se requiere de señales secuenciales para obtener una desencapsidación total (Greber *et al.*, 1994).

2. El virus no sufre cambios entre su liberación de la célula infectada y su encuentro con una célula nueva, más bien el ambiente celular es el diferente. Al respecto se propone la existencia de un factor celular “desencapsidante” que puede estar presente en células no infectadas y que llega a inactivarse durante el curso de la infección para permitir el ensamble de la progenie viral. Este mecanismo parece ser el responsable, al menos en parte, del desnudamiento de los alfavirus (Greber *et al.*, 1994, Singh & Helenius, 1992).

3. El ambiente celular es el mismo. El virus al ser liberado de una célula infectada, pasa por compartimentos celulares diferentes a los que encuentra durante el inicio de la infección (Greber *et al.*, 1994). Así, un virus saliente evade las condiciones celulares que pudieran causar su desencapsidación. Hasta ahora no se ha demostrado que este mecanismo sea utilizado por algún sistema viral en particular.

En lo que se refiere al desnudamiento de los rotavirus se sabe que la activación de la RNA polimerasa viral con la consecuente síntesis del RNAm, requiere que el virión pierda la capa externa (Cohen *et al.*, 1979, Spencer & Arias, 1981). *In vitro*, el tratamiento de partículas virales completas (triple capa) con agentes quelantes de calcio como EDTA resulta en la remoción de las proteínas de capa externa y genera viriones de doble capa que son transcripcionalmente activos (Cohen *et al.*, 1979). Aunado a esto Ludert y colaboradores encontraron que el incremento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) causado por

el ionóforo A23187, añadido minutos después del inicio de la penetración, inhibe la formación de partículas de doble capa en el rotavirus porcino OSU (Ludert *et al.*, 1987).

En base a éstos resultados, se ha sugerido la hipótesis de que *in vivo*, durante la penetración, los rotavirus pierden la capa externa al entrar en contacto con el citoplasma celular cuya concentración de calcio es varias órdenes de magnitud por debajo del medio extracelular (~ 100 nM vs ~ 1 mM) (Cohen *et al.*, 1979, Ludert *et al.*, 1987).

Por otro lado se ha propuesto una hipótesis alterna la cual establece que durante la interacción del virus con su receptor (es), la partícula viral tiene cambios conformacionales que promueven la pérdida de las proteínas de capa externa, así se desencapsida y solo partículas sin esta capa son internalizadas al citoplasma celular. Esta hipótesis se basa en la observación mencionada anteriormente de que durante la infección con el rotavirus KITN activado con tripsina, las proteínas VP4 y VP7 permanecen asociadas a la superficie celular y que únicamente las partículas de doble capa son internalizadas (Fukuhara *et al.*, 1988).

Pese a todos estos trabajos sobre la vía de entrada y el mecanismo de desencapsidación de los rotavirus, el conocimiento a nivel detallado de la penetración y desnudamiento de los virus potencialmente infecciosos no se ha establecido por falta de metodología que específicamente detecte la entrada de las partículas infecciosas. Los resultados obtenidos por las técnicas de microscopía electrónica y por los ensayos de resistencia de virus marcados radioactivamente a tratamientos con proteasas externas deben ser interpretados con cautela, ya que no discriminan la entrada de virus infecciosos y la de partículas no infecciosas. En el caso de rotavirus ésta es una cuestión relevante, ya que se ha estimado que la relación de partículas físicas/partículas infecciosas en algunas cepas de rotavirus es de cuando menos 100:1 (Bass *et al.*, 1995).

PERMEABILIZACION TEMPRANA DE LA MEMBRANA INDUCIDA DURANTE LA INTERACCION DE VIRUS CON SU CELULA HUESPED.

En varios sistemas virales como el virus Semiliki Forest, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus vaccinia, adenovirus y poliovirus se ha demostrado que la interacción del virus con su receptor induce una permeabilización temprana de la membrana celular a macromoléculas como toxinas y plásmidos (Almela *et al.*, 1991, Fernández-Puentes & Carrasco, 1980, García *et al.*, 1996, Guinea & Carrasco, 1995, Pérez & Carrasco, 1994).

Las células no tienen receptores específicos para estas macromoléculas por lo que éstas son incapaces de atravesar la membrana por sí solas (Fernández-Puentes & Carrasco, 1980); sin embargo, se ha observado que las partículas virales remplazan esta función cuando se añaden simultáneamente a la toxina y prácticamente el 100% de las células son permeabilizadas en cuestión de minutos (Carrasco, 1994, Carrasco, 1995).

Esta cointernalización parece ser un fenómeno recurrente entre los distintos sistemas virales y es independiente del mecanismo que éstos utilicen para penetrar a su célula huésped. Los virus que entran por endocitosis como poliovirus ó adenovirus; al igual que virus que fusionan su envoltura lipídica a nivel de membrana plasmática como el virus de Sendai ó a nivel de endosomas como Semliki, inducen ésta permeabilización temprana a macromoléculas (Pérez & Carrasco, 1993, Pérez & Carrasco, 1994)

Las macromoléculas más utilizadas para el estudio de coentrada, son las toxinas que actúan a nivel intracelular como inhibidores de la síntesis de proteínas (Brigotti *et al.*, 1989). El mecanismo de acción de la mayoría de estas toxinas involucra dos pasos: el reconocimiento de un receptor celular con la unión de la toxina a la membrana, seguido de la internalización al citoplasma. La abrina, es una toxina de origen vegetal, está compuesta por dos subunidades polipeptídicas que se unen por puentes disulfuro, la presencia simultánea de ambas subunidades inhibe la síntesis de proteínas en células intactas, mientras que la subunidad A por sí sola no muestra tal actividad. La subunidad B (mejor conocida como haptómero) se une a un receptor celular y es responsable de la translocación de la subunidad A (efectómero) al citoplasma celular (Fernández-Puentes & Carrasco, 1980). Poco se sabe de los eventos moleculares involucrados en la internalización, lo que sí es claro es que la subunidad A debe alcanzar el citosol donde inactiva a los ribosomas y detiene así la maquinaria de traducción. El efectómero de estas toxinas actúa catalíticamente sobre la subunidad 60S de los ribosomas eucariotes por lo tanto, bloquea la interacción de los factores de elongación con ésta subunidad (Brigotti *et al.*, 1989, Endo & Wool, 1982). La restrictocina, α -sarcina y mitogilina son toxinas que únicamente inhiben la síntesis de proteínas *in vitro*, lo que sugiere que se componen de una subunidad proteínica que es análoga en función a la subunidad A de la abrina. A la fecha, no se conoce la existencia de un receptor celular específico para estas toxinas (Fernández-Puentes & Carrasco, 1980).

La coentrada de toxinas se ha tomado como una medida de la penetración del virus hacia el citoplasma de la célula. Por ejemplo, en poliovirus que es uno de los virus que más eficientemente promueve la coentrada de toxinas, se ha observado que la permeabilización a α -sarcina requiere de la interacción específica virus-receptor; ya que solo ocurre en células que expresan la molécula receptora para el virus como la línea celular HeLa y no en células no susceptibles como L ó BHK (Otero & Carrasco, 1987). Adicionalmente, la permeabilización se bloquea con anticuerpos dirigidos contra las proteínas estructurales del virus; así como con drogas que inhiben su desencapsidación (Almela *et al.*, 1991).

El mecanismo a través del cual ocurre esta coentrada de toxinas no se entiende del todo ; sin embargo, el hecho de que la síntesis de proteínas sea inhibida por éstas toxinas (tienen como blanco los ribosomas), indica que la toxina tiene que alcanzar el citoplasma para ejercer su acción

El modelo “mecánico” que ha sido propuesto para explicar la translocación de los genomas virales de virus con membrana lipídica hacia el citoplasma, propone que las glicoproteínas virales cambian su conformación ya sea por la unión con su receptor, ó por el ambiente ácido de los endosomas lo cual induce la fusión entre las membranas virales y celulares, provocando así la translocación del virus al interior de la célula.

A éste respecto, Carrasco y colaboradores por su parte han cuestionado si el disparador de la translocación es el bajo pH intra-endosomal ó si en realidad es provocada por el gradiente de H^+ que existe a través de la membrana del endosoma (Carrasco, 1994, Carrasco *et al.*, 1989).

Bafilomicina A1 y concanamycin A son inhibidores altamente selectivos de la ATPasa de protones vacuolar (v- $[H^+]$ -ATPasa), éstas drogas bloquean la acidificación de los endosomas y rompen el gradiente de protones que existe en las vesículas del sistema vacuolar (Bowman *et al.*, 1988, Drose *et al.*, 1993). El uso de estos antibióticos ha sido una herramienta muy selectiva para elucidar el mecanismo por el cual se da la translocación del genoma y/o toxinas al citoplasma en los distintos sistemas virales; incluso en aquellos que se creía indispensable un paso intermediario de bajo pH para su internalización. Como resultado del análisis exhaustivo del mecanismo de penetración de distintos virus con éstas drogas, Carrasco y colaboradores han propuesto un modelo “protomotriz”, en el que establecen que el gradiente de pH generado en los endosomas por la v- $[H^+]$ -ATPasa es utilizado como fuente

de energía para la translocación del genoma viral (ó toxinas) hacia el citoplasma (Carrasco, 1994, Carrasco, 1995).

Por su parte, aquellos virus que entran independientemente del pH endosomal, utilizarían el potencial de membrana ó directamente el ATP como fuente de energía para translocar su genoma (y las toxinas) al citoplasma (Carrasco, 1995).

SISTEMA DE PSEUDO-PARTICULAS VIRALES.

En la búsqueda de nueva metodología de trabajo con rotavirus, se desarrolló un sistema de ensamble de pseudopartículas virales [Virus like particles (VLP's)] utilizando el sistema de expresión de proteínas heterólogas en baculovirus (Crawford *et al.*, 1994). La coinfección de células de insecto con baculovirus recombinantes que codifican para cada una de las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6 y VP7 de rotavirus resulta en la producción de VLP's semejantes a partículas virales maduras (figura 5). Dichas VLP's son microscópicamente similares a virus nativos, mantienen las características estructurales de un rotavirus, inmunológicamente conservan epítopes neutralizantes y no neutralizantes, e inducen una respuesta inmune protectora cuando son inoculadas en ratones (Crawford *et al.*, 1994). En estudios funcionales se ha observado que las VLP's son capaces de unirse a células epiteliales en cultivo y de promover la fusión desde afuera en células preincubadas con colesterol; ambas funciones dependen de la presencia de la proteína VP4 ensamblada en la pseudo-partícula viral (Crawford *et al.*, 1994, Gilbert & Greenberg, 1997).

Estas VLP's ofrecen la posibilidad de introducir cambios dirigidos a las proteínas estructurales del rotavirus; la limitante es que carecen de genoma viral por lo que no son infecciosas y, por lo tanto, los estudios que se pueden llevar a cabo con ellas son limitados.

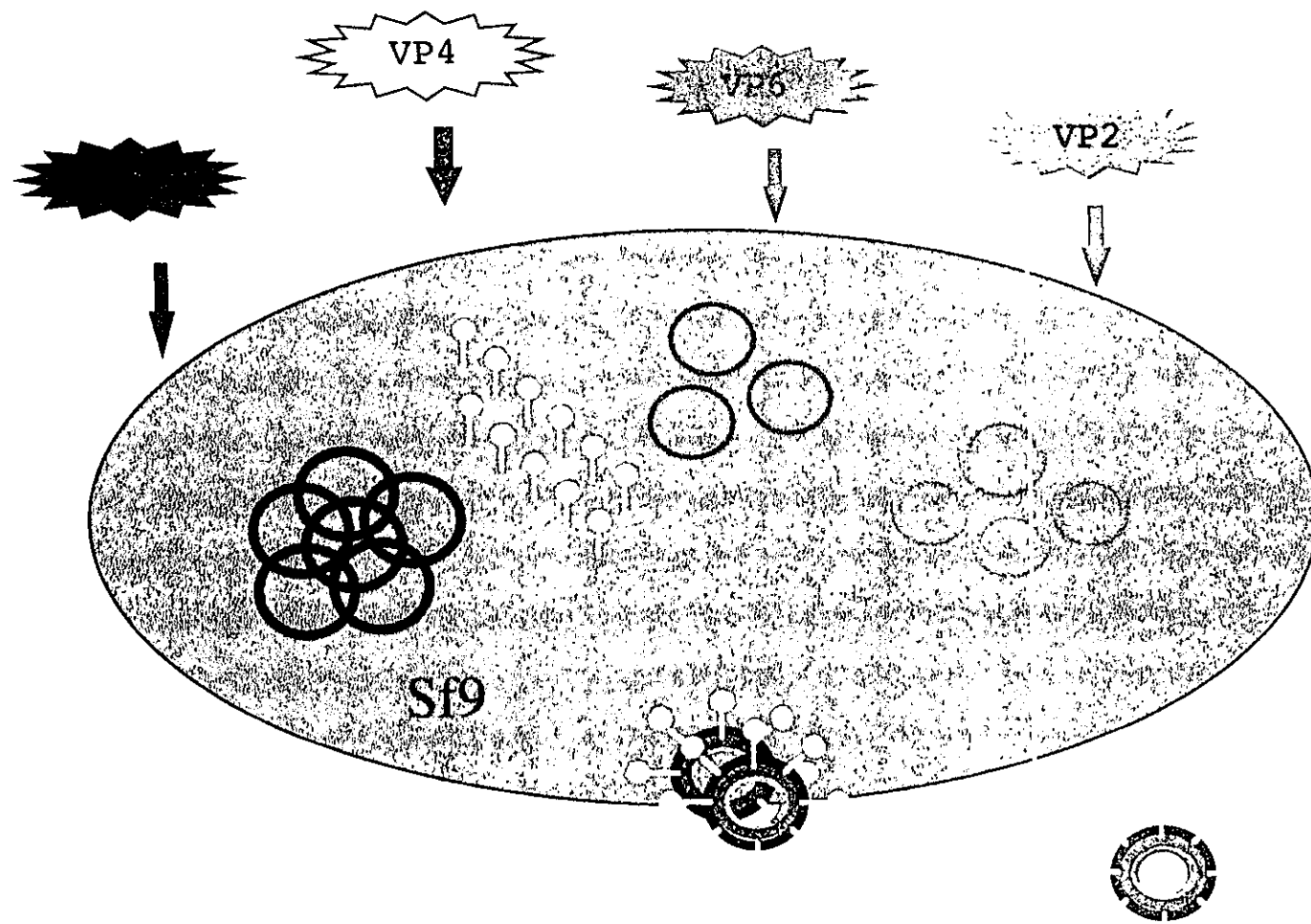


Figura 5. Representación esquemática del ensamble de VLP's utilizando el sistema de expresión de baculovirus.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente, la penetración de los rotavirus a su célula huésped es posterior a la interacción inicial del virus con la superficie celular. Esta penetración (y consecuentemente la infectividad del rotavirus) se puede aumentar y depende del corte proteolítico de la proteína VP4 con tripsina, el cual es altamente específico y se restringe a los residuos de arginina en las posiciones 231, 241 y 247 de la proteína VP4.

Por otro lado, se ha propuesto que la región hidrofóbica de VP5 (aa 384-401) podría funcionar como una posible región de fusión. Actualmente, se desconoce cuál es el papel de ésta región hidrofóbica (si es que tiene alguno); lo que sí está claro es que las partículas virales tratadas con tripsina son más hidrofóbicas y pueden interaccionar con liposomas y vesículas de membrana *in vitro*. Como se mencionó, ésta interacción depende del corte con tripsina y es inhibida por un anticuerpo monoclonal que mapea cerca de la región hidrofóbica en VP5.

Los métodos tradicionalmente utilizados en el estudio del mecanismo de penetración de rotavirus como microscopía electrónica y protección de virus radiomarcados a la digestión de proteasas externas, carecen de sensibilidad, ya que no distinguen entre la entrada de partículas infecciosas que conducen a una infección productiva, y la internalización de partículas físicas no infecciosas; como se mencionó ésta es una cuestión de gran relevancia en rotavirus, ya que se ha observado que en una preparación de virus la proporción de partículas físicas: partículas infecciosas es cuando menos 100:1.

En lo que se refiere al proceso de desnudamiento en rotavirus, los pocos avances en el campo se han realizado con trabajos *in vitro*, que se restringen a describir la actividad de la transcriptasa del virus y la estabilidad de las partículas virales en distintas concentraciones de calcio; éstos resultados hacen suponer que la baja concentración de calcio intracelular es el disparador del desnudamiento. Sin embargo, *in vivo* aún no se ha establecido claramente si los rotavirus se desencapsidan durante la penetración ó una vez que han ingresado al citoplasma celular.

Este trabajo se realizó con el objetivo de aprender acerca de las interacciones iniciales rotavirus-célula huésped que conducen a una infección productiva; específicamente, las referentes a penetración y desencapsidación de la partícula viral.

La estrategia experimental planteada para el estudio del mecanismo de penetración se basó en desarrollar un sistema de penetración de pseudopartículas virales (VLP's). A pesar de

que las VLP's de rotavirus comparten características estructurales e inmunológicas con los viriones nativos, tienen la limitante de que carecen de genoma viral, por lo tanto, no son infecciosas y los estudios de penetración de las mismas requerían del desarrollo de una estrategia experimental especial. Debido a ésta limitante nos propusimos desarrollar un método que nos permitiera determinar de una manera indirecta la penetración de la partícula viral. Para lograr éste objetivo se validó la técnica de coentrada de toxinas dependiente de la entrada de rotavirus. En virtud de que las toxinas son impermeables por sí solas a la célula, su ingreso al citoplasma estaría evidenciando que las VLP's penetraron.

Dado que la coentrada de toxinas inducida por la interacción de virus con su célula huésped parecía ser un fenómeno generalizado entre los distintos sistemas virales, nos planteamos determinar si la interacción del rotavirus con la célula huésped inducía una permeabilización temprana de la membrana, de tal manera que promoviera la coentrada de macromoléculas impermeables como α -sarcina.

La estrategia utilizada para abordar el problema de la desencapsidación de rotavirus *in vivo*, consistió en alterar la homeostásis de Ca^{2+} mediante compuestos, que incrementan la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), como ionóforos de calcio (ionomicina y A23187) y tapsigargina (bloqueador de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico), con el uso de éstos compuestos pretendíamos determinar si el incremento de ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) afectaba los primeros eventos de la infección, como son la penetración, la infectividad, el desnudamiento y la síntesis de proteínas virales.

De igual manera, utilizando el ensayo de permeabilización a toxinas como reflejo de penetración viral, podríamos determinar si éste proceso es influenciado por los cambios de ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

HIPOTESIS

Las evidencias experimentales sobre los mecanismo de penetración y desencapsidación de los rotavirus sugieren que la vía de entrada de los virus infecciosos es por penetración directa y que la desencapsidación se da como consecuencia de la baja concentración de calcio intracelular. En base a estos antecedentes, nuestras hipótesis de trabajo fueron:

1. Las primeras interacciones del rotavirus con su célula huésped inducen una permeabilización temprana de la membrana, promoviendo así la coentrada de toxinas impermeables a la célula, de una manera específica y dependiente de la infectividad del virus.
2. La diferencia de concentración de calcio entre el citoplasma y el medio extracelular, puede ser el factor responsable de la desencapsidación de los rotavirus.
3. Si las proteínas estructurales de rotavirus mantienen su conformación cuando se ensamblan en el sistema de VLP's, las VLP's serán capaces de reproducir los resultados obtenidos con el virus al ser utilizadas en ensayos de permeabilización.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterización de las primeras interacciones del rotavirus con su célula huésped.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

I Caracterización del proceso de penetración de los rotavirus.

- I.1 Determinar si la interacción del rotavirus con la célula huésped en cultivo induce una permeabilización temprana de la membrana a macromoléculas impermeables como toxinas.
- I.2 Caracterizar el sistema de coentrada de toxinas impermeables a la célula, mediada por la entrada de rotavirus.
- I.3 Determinar si las VLP's de rotavirus penetran, y si esta penetración es VP4 y tripsina dependiente.

II Caracterización del proceso de desnudamiento de los rotavirus.

- II.1 Determinar el papel de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en el desnudamiento de rotavirus.
- II.2 Determinar si la permeabilización a α -sarcina inducida por rotavirus y la infectividad viral se ven afectadas por el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.
- II.3 Determinar el efecto del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la síntesis de proteínas virales.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La metodología utilizada en el desarrollo de este trabajo, se incluyen en la sección de materiales y métodos del artículo incluido en resultados, con excepción de la metodología de producción y purificación de VLP's que describo a continuación.

OBTENCION Y PURIFICACION DE VLP'S.

La producción de VLP's se realizó infectando un cultivo en suspensión de la línea de células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Para cada coinfección, se crecieron de 200 a 300 ml de células Sf9 hasta alcanzar una densidad celular promedio de 3×10^6 células/ml. Al término del periodo de crecimiento, las células se centrifugaron 10 min. a 1000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21, se resuspendieron en el inóculo viral a una densidad aproximada de 1×10^7 células/ml, y se infectaron a 27 °C por un periodo de 2 a 4 hr. La multiplicidad de infección utilizada fué de 5 partículas infecciosas de cada virus recombinante/célula. Posteriormente, se retiró el inóculo por centrifugación y el cultivo se resuspendió en medio "Grace's" suplementado al 0.5 % con suero fetal bovino (Crawford *et al.*, 1994).

Seis días post-infección, el cultivo se centrifugó 10 min a 1000 rpm en la centrífuga Beckman J2-21. Al término de ésta clarificación, el medio se sometió a una segunda centrifugación durante 30 min. a 14,000 rpm en la misma centrífuga. Las partículas se purificaron del sobrenadante por ultracentrifugación sobre un colchón de sacarosa al 35% en "buffer" TNC (ver artículo anexo), la ultracentrifugación se realizó a 25,000 rpm por 2 hr. en el rotor SW28 (Beckman). Los "pellets" obtenidos se sometieron a gradientes de CsCl (índice de refracción 1.3620) por 18 hr. a 4 °C y 35,000 rpm en el rotor SW50.1 (Crawford *et al.*, 1994). Otra opción de centrifugación para los gradientes fué utilizar el rotor TLA 100.4 de la ultracentrífuga Optima (Beckman) durante 4 hr. a 90,000 rpm. Las bandas opalescentes obtenidas en el gradiente se colectaron con micropipeta y fueron sometidas a un segundo gradiente bajo las mismas condiciones.

La banda que contenía las VLP's fué diluída en TNC y ultracentrifugada a 35,000 rpm (2 hr., 4 °C) en el rotor SW50.1. El pellet se resuspendió en el mismo "buffer" y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Para cada lote de partículas producido, se analizó la presencia de cada una de las proteínas estructurales en las VLP's por medio de geles de poliacrilamida-SDS y Western blot.

RESULTADOS

“Rotaviruses Induce an Early Membrane Permeabilization of MA104 Cells and do not Require a Low Intracellular Ca²⁺ Concentration To Initiate Their Replication Cycle”

Resultados correspondientes a los objetivos I.1, I.2 y II se incluyen en éste artículo el cual fué publicado en el Journal of Virology el mes de diciembre de 1997.

Rotaviruses Induce an Early Membrane Permeabilization of MA104 Cells and Do Not Require a Low Intracellular Ca^{2+} Concentration To Initiate Their Replication Cycle

MARIELA A. CUADRAS, CARLOS F. ARIAS, AND SUSANA LÓPEZ*

*Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca,
Morelos 62250, Mexico*

Received 19 March 1997/Accepted 20 August 1997

In this work, we found that rotavirus infection induces an early membrane permeabilization of MA104 cells and promotes the coentry of toxins, such as α -sarcin, into the cell. This cell permeability was shown to depend on infectious virus and was also shown to be virus dose dependent, with 10 infectious particles per cell being sufficient to achieve maximum permeability; transient, lasting no more than 15 min after virus entry and probably occurring concomitantly with virus penetration; and specific, since cells that are poorly permissive for rotavirus were not permeabilized. The rotavirus-mediated coentry of toxins was not blocked by the endocytosis inhibitors dansylcadaverine and cytochalasin D or by the vacuolar proton-ATPase inhibitor bafilomycin A1, suggesting that neither endocytosis nor an intravesicular acidic pH or a proton gradient is required for permeabilization of the cells. Compounds that raise the intracellular concentration of calcium ($[Ca^{2+}]_i$) by different mechanisms, such as the calcium ionophores A23187 and ionomycin and the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin, did not block the coentry of α -sarcin or affect the onset of viral protein synthesis, suggesting that a low $[Ca^{2+}]_i$ is not essential for the initial steps of the virus life cycle. Since the entry of α -sarcin correlates with virus penetration in all parameters tested, the assay for permeabilization to toxins might be a useful tool for studying and characterizing the route of entry and the mechanism used by rotaviruses to traverse the cell membrane and initiate a productive replication cycle.

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are nonenveloped viruses that possess a genome of 11 segments of double-stranded RNA contained in a triple-layer protein capsid (44). The outermost layer is composed of two proteins, VP4 and VP7. The smooth external surface of the virus is made up of 780 copies of glycoprotein VP7, while 60 spikelike structures, formed by dimers of VP4, extend about 12 nm from the VP7 surface (2, 38).

VP4 has essential functions in the virus life cycle, including receptor binding and cell penetration (15). The properties of this protein are therefore important determinants of host range, virulence, and induction of protective immunity. In addition, the infectivity of rotaviruses is increased by and most probably is dependent on trypsin treatment of the virus, and this proteolytic treatment results in the specific cleavage of VP4 to polypeptides VP8 and VP5 (14, 16). The cleavage of VP4 does not affect cell binding (9, 20, 27) and has been associated with the entry of the virus by direct cell membrane penetration (27, 35, 41). The role of VP7 during the early interactions of the virus with the cell is not clear, although it has been shown that it can modulate some of the VP4-mediated virus phenotypes, including receptor binding (33).

Rotavirus infection is highly restricted *in vivo* to the mature villus tip cells of the small intestine. *In vitro* infection is also restricted, being most permissive in a variety of epithelial cell lines of renal and intestinal origins (15). Most animal rotaviruses bind to the cell surface through a sialic acid-containing

cell receptor (15). This interaction, however, is nonspecific and can be superseded by an interaction with a secondary receptor which has been proposed to be more specific and may explain, at least in part, the tropism of these viruses (5, 32).

The mechanism by which rotaviruses enter the host cell is still a matter of debate. Most available data are compatible with the virus entering the cell by direct penetration at the plasma membrane level; however, these data do not completely rule out the possible entrance of the virus by endocytosis (20, 46). Both mechanisms appear to take place, but it has been proposed that the entry of the virus through the endocytic route leads to a nonproductive infection (4, 20, 46, 47). This proposal is based on the fact that treatment of cells with lysosomotropic agents, which raise the endosomal pH, or with drugs that block endocytosis or the intracellular transit of endocytic vesicles (4, 21, 27, 31) does not affect the infectivity of rotaviruses. Additional support is provided by the observation that uncleaved, nonactivated virus is preferentially taken up by the endocytic route (27, 46).

After the virus enters the cell, viral transcriptase is activated and the synthesis of viral mRNAs is initiated. *In vitro* treatment of complete viral particles with chelating agents results in the removal of the outer-layer proteins, VP4 and VP7, leading to transcriptionally active double-layer particles (10, 45). It has been suggested that *in vivo* the penetration of virions into the cell cytoplasm, which has a Ca^{2+} concentration several orders of magnitude lower than that in the extracellular medium, may be the factor that triggers the uncoating of the virus and activates viral transcriptase (10, 31). Little is known, however, about the mechanism by which rotaviruses uncoat during the infection process.

It has been shown for many different viruses that the entry of viral particles into the cell interior induces an early membrane

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Phone: (52) (5) 6227615. Fax: (52) (73) 172388. E-mail: susana@ibt.unam.mx.

permeabilization of the cell, allowing the coentry of macromolecules, such as toxins (7, 18). The mechanism by which this coentry occurs is still not well understood; however, it seems to be a rather general phenomenon that takes place irrespective of the route of entry of the virus. Thus, enveloped viruses that enter via receptor-mediated endocytosis or enveloped viruses that enter the cell by fusion of the envelope with the cell membrane as well as nonenveloped viruses, such as poliovirus, effectively promote the coentry of toxins (8). Since the toxins most commonly used in the permeabilization assays, such as the 16.8-kDa RNase α -sarcin, severely arrest cellular protein synthesis (6, 12), they represent excellent tools for investigating the permeabilization event induced by viruses and therefore the mechanism of virus entry.

In this work, we have characterized the rotavirus-induced early permeabilization of monkey kidney (MA104) cells to toxins in an effort to learn about the initial virus-cell interactions. We found that the virus-mediated coentry of α -sarcin depends on the entry of infectious virus, is cell specific, and is not blocked by drugs that affect endocytosis or the activity of the vacuolar proton-ATPase. Also, we found that increases in the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) did not block the coentry of α -sarcin or the onset of viral protein synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. MA104 and L929 cells (L cells) were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM); HEp-2 cells were grown in RPMI 1640 medium. Both culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum. Rotavirus RRV was obtained from H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, Calif.; rotavirus SA114S (clone 3) was provided by M. K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston, Tex. RRV and SA114S viruses were propagated in MA104 cells as previously described (13). Reovirus serotype 1 was obtained from C. Ramos, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico, and was grown in L cells.

To prepare semipurified virus, virus-infected cells were harvested after complete cytopathic effect was attained, the cell lysate was extracted with Freon, and the virus was pelleted through a 4-ml cushion of 35% sucrose in TNC buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) by centrifugation for 2 h at 26,000 rpm and 4°C in an SW28.1 rotor (Beckman). The virus pellet was resuspended in TNC buffer and kept at 4°C until use. To obtain non-trypsin-cleaved rotavirus, the cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) after adsorption of the trypsin-treated virus, and the virus preparation was kept on ice at all times during harvesting. The titer of the infectious virus preparations was obtained by an immunoperoxidase focus assay with MA104 cells as previously described (29). Titers are expressed as focus-forming units (FFU) per milliliter.

To prepare a lysate of reovirus, monolayers of L cells were infected for 1 h at 37°C with reovirus serotype 1. After this time, the inoculum was removed and MEM containing 2% fetal bovine serum was added, and the cells were kept at 37°C until complete cytopathic effect was reached. The titer of infectious virus was obtained by the immunoperoxidase focus assay with L cells and a polyclonal antibody against reovirus serotype 1 (kindly provided by T. Dermody, Vanderbilt Medical School, Nashville, Tenn.).

Permeabilization assay. Confluent monolayers of MA104 cells in 96-well tissue culture plates were infected with 10 FFU of trypsin-activated (unless otherwise indicated) rotavirus per cell in the presence of various concentrations of toxin. At 1 h after adsorption at 37°C, the virus inoculum and the toxin were removed, and fresh serum-free MEM was added for an additional period of 30 min. After this time, the medium was replaced with methionine-free MEM supplemented with 25 μ Ci of the ³⁵S-protein labeling mix EXPRE³⁵S (>1,000 Ci/mmol; Dupont) per ml, and the cells were incubated for 1 h at 37°C. After the labeling period, the cells were washed with PBS, treated with 5% trichloroacetic acid (TCA) for 5 min at room temperature, and washed three times with ethanol. The cell monolayer was allowed to dry under a lamp before the addition of 50 μ l of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.1 N NaOH. Total radioactivity in the sample was determined by liquid scintillation counting by solubilizing the sample in Ecolite (ICN). The toxins abrin, restrictocin A, and α -sarcin were purchased from Sigma Chemical Co.

PAGE. To analyze the ³⁵S-labeled proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), permeabilization assays were performed in 24-well tissue culture plates basically as described above but with some modifications. After the ³⁵S-labeling period, the cell monolayers were washed twice with PBS and dissolved in 150 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 μ g of phenylmethylsulfonyl fluoride per ml). Nuclei and cell debris were pelleted at 5,000 rpm in an Eppendorf centrifuge for 10 min,

and 10 μ l-aliquots of the supernatant were mixed with an equal volume of Laemmli sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 10% glycerol). Samples were boiled for 3 min, and the proteins were separated by electrophoresis on SDS-11% polyacrylamide gels with the discontinuous buffer system of Laemmli. After electrophoresis, the gels were treated for fluorography with 1 M sodium salicylate and exposed to film at -70°C.

Virus treatments. (i) **Preparation of double-layer particles.** Aliquots of semipurified RRV virus were incubated with 50 mM EDTA for 30 min at 37°C or mock treated with PBS. Removal of the virus outer capsid was assessed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining of the treated and nontreated viral particles, and the titer of the EDTA-treated virus was determined as described above.

(ii) **Protease treatments.** SA114S rotavirus obtained in the absence of trypsin was digested with 10 μ g of diphenylcarbamyl chloride-treated trypsin (Sigma) per ml, 1 μ g of AspN (Boehringer Mannheim Biochemicals; sequencing grade) per ml, or 2 μ g of α -chymotrypsin (Boehringer; sequencing grade) per ml for 30 min at 37°C. Half of the AspN- and α -chymotrypsin-digested virus preparations were further treated with 10 μ g of trypsin per ml for 30 min at 37°C.

(iii) **MAB treatments.** Immediately before the permeabilization assays, RRV rotavirus (10 FFU/cell) was preincubated for 1 h at 37°C with a 1:100 dilution of ascites of neutralizing monoclonal antibodies (MAbs) M14, M11, 1A9, 7A12, and 159 or nonneutralizing MAbs 129/60 and 255/60 or with a 1:150 dilution of neutralizing MAb 2G4. These MAbs were kindly provided by H. B. Greenberg, Stanford University. Nonneutralizing MAb HS2 was used at a 1:100 dilution and was generously supplied by Luis Padilla-Noriega, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico. The neutralization titers of these MAbs against RRV, as determined by an immunoperoxidase focus reduction assay (29), were 1:25,600 for MAbs 159, 2G4, 7A12, and 1A9; 1:3,200 for MAb M14; 1:400 for MAb M11; and <1:200 for MAbs 129/60, 255/60, and HS2.

Cell treatments. Monolayers of MA104 cells were treated prior to infection with 20 mU of *Arthrobacter ureafaciens* neuraminidase (Sigma) per ml for 1 h at 37°C as previously described (32) or with various concentrations of baflomycin A1 (BFLA1), dansylcadaverine, cytochalasin D, A23187, ionomycin, or thapsigargin (Sigma). The drug-treated cells were used to determine the infectivity of the virus and the ability of the viral particles to permeabilize the cells to α -sarcin; in these experiments, the drugs were maintained at the appropriate concentrations during the adsorption period.

Determination of the $[Ca^{2+}]_i$. The $[Ca^{2+}]_i$ was measured with the fluorescence indicator fura-2. MA104 cell monolayers were trypsinized, washed twice with serum-free MEM, and resuspended in loading buffer (132.4 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1% bovine serum albumin) containing 10 μ M fura-2/AM (Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Following a 60-min incubation at 37°C, the cells were washed twice and resuspended at 2×10^6 cells/ml in loading buffer without bovine serum albumin. Fluorescence was measured at 37°C with continuous stirring in an Aminco 8000C spectrofluorimeter (SLM Instruments, Urbana, Ill.). The excitation and emission wavelengths were fixed at 340 and 510 nm, respectively. The $[Ca^{2+}]_i$ was calculated with the equation of Tsien et al. (50), modified by Guerrero and Darzon (24), with an apparent K_d for fura-2 of 224 nM (34). To calibrate the fluorescence signal of the fura-2 associated with the cells, minimum fluorescence and maximum fluorescence were determined by releasing fura-2 from the cells with 0.05% Triton X-100 in the absence of extracellular calcium and by the subsequent addition of 2 mM CaCl₂ to the permeabilized cells. To quench fura-2 fluorescence, 6 mM MnCl₂ was added.

RESULTS

Rotavirus infection mediates the entry of toxins. It has been shown for several virus families that the entry of viral particles into the cell induces an early permeabilization of the cell membrane. This permeabilization has been detected, among other methods, by monitoring the coentry of toxins with the virus during cell infection. In this work, we tested if rotaviruses were able to promote the permeabilization of MA104 cells to abrin, restrictocin A, and α -sarcin. These three toxins are potent inhibitors of the cell translation machinery, and their activity in the cytosol results in a severe arrest of protein synthesis. When added in the absence of virus, the toxins, at the concentrations tested, had a slight or no effect on the protein synthesis of MA104 cells, as measured by the incorporation of ³⁵S-labeled amino acids. However, when they were added in the presence of 10 FFU of rhesus monkey rotavirus RRV per cell, a drastic reduction in protein synthesis was observed (Fig. 1). Abrin was about 1,000-fold more active than the other two toxins, although, as was the case for restrictocin A, there was some leakage into the cells in the absence of virus. Since α -sarcin showed a more strict dependence on the presence of virus to

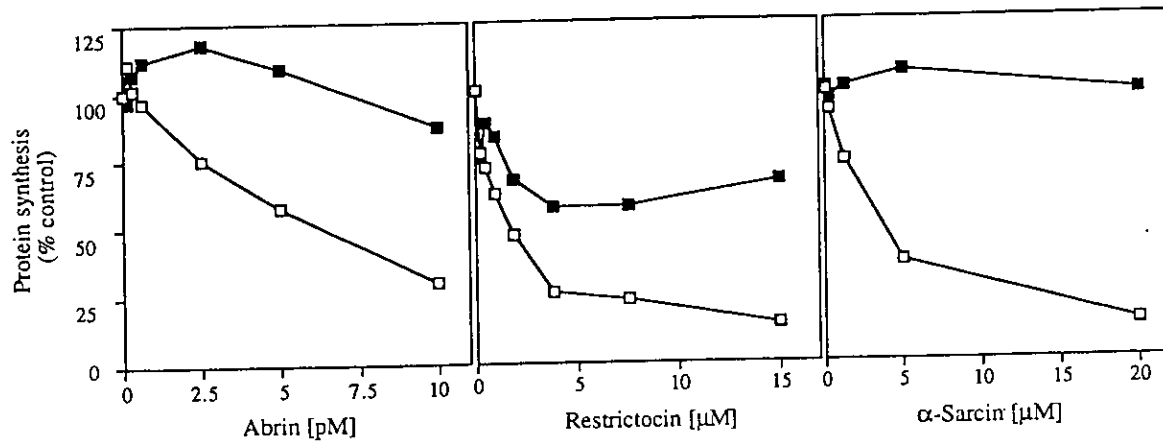


FIG. 1. Rotavirus infection mediates the entry of toxins. MA104 cells in 96-well plates were mock infected (closed squares) or infected (open squares) with 10 FFU of trypsin-activated RRV virus per cell in the presence of the indicated concentrations of abrin, restrictocin A, or α -sarcin. After 1 h of adsorption at 37°C, the virus inoculum was removed and fresh serum-free MEM was added for 30 min. The cells were then labeled with EXPRE³⁵S for 1 h at 37°C, and the radioactivity present in the TCA-precipitable material was estimated. Data are expressed as a percentage of the ³⁵S incorporation of control cells infected or mock infected in the absence of toxins. The values represent the means for duplicate wells.

enter the cell and was able to inhibit by more than 80% cell protein synthesis when RRV was added, this toxin was used in all subsequent experiments to characterize the specificity of the coentry of toxins mediated by rotavirus.

Rotavirus-induced cell permeabilization is virus dose dependent. The effect of the virus multiplicity of infection (MOI) on the permeabilization event was determined in the range of 0.1 to 25 FFU of RRV virus per cell with 7.5 μM α -sarcin. There was already inhibition of the incorporation of ³⁵S-labeled amino acids into proteins when the cells were incubated with as little as 0.1 FFU/cell, and this inhibition became more pronounced as the MOI increased to 10 (Fig. 2). Protein synthesis was inhibited to about 50% that in control cells (mock-infected cells incubated with toxin) when RRV at an MOI of 1 was used, showing a good correlation between the coentry of toxin and the addition of infectious viral particles.

Coentry of α -sarcin is dependent on infectious virus. To determine if the entry of α -sarcin is promoted by infectious rotavirus particles and not by noninfectious physical particles, several conditions known to affect the infectivity of the virus were tested for their effect on the coentry of toxin.

(i) **EDTA treatment.** Treatment of infectious rotavirus particles with calcium-chelating agents is known to remove surface proteins VP4 and VP7, with the consequent abolition of virus infectivity (10, 43). In this work, treatment of semipurified RRV virus with 50 mM EDTA for 30 min at 37°C reduced virus infectivity by more than 4 log units (from 1×10^8 FFU/ml to $<0.5 \times 10^4$ FFU/ml). The EDTA-treated virus failed to promote the coentry of α -sarcin when used at a concentration equivalent to an MOI of 10 for the untreated virus (Fig. 3A). These results indicate that the entry of toxin into the cell requires the presence of VP4 and VP7 assembled into the virus surface.

(ii) **Sialic acid removal from the cell surface.** Most rotaviruses of animal origin initially attach to the cell surface through a sialic acid-containing cell receptor, and treatment of cells with neuraminidase greatly reduces the binding of viral particles, with the consequent reduction of virus infectivity (19, 28, 32, 51). To test if the permeabilization of cells requires the binding of virus to the cell surface, we assayed the rotavirus-mediated entry of toxin in cells that had been treated with neuraminidase in conditions that abolish the infectivity of the virus by 80 to 90% (32). Neuraminidase-treated and untreated

cells were infected with RRV virus at an MOI of 10 in the presence of different concentrations of α -sarcin. In contrast to the permeabilization observed in untreated cells, cells devoid of sialic acid were not permeabilized to the toxin (Fig. 3B), indicating that the specific attachment of virus to the cell surface is necessary to modify the permeability of the membrane.

(iii) **Protease treatment.** The incubation of rotaviruses with trypsin activates virus infectivity through the specific cleavage of the VP4 protein in three arginine residues located at amino acid positions 231, 241, and 247 (3, 30). It has been shown that the cleavage of VP4 is required for entry of the virus into the cell, since viruses with an uncleaved protein attach to the cell surface as efficiently as cleaved virions but are not infectious (9, 20, 27). Therefore, to determine if virus penetration was the step associated with the coentry of α -sarcin, we produced RRV virus under conditions in which most VP4 molecules are not cleaved. This RRV preparation was activated *in vitro* with trypsin, and its infectivity was determined; the untreated virus

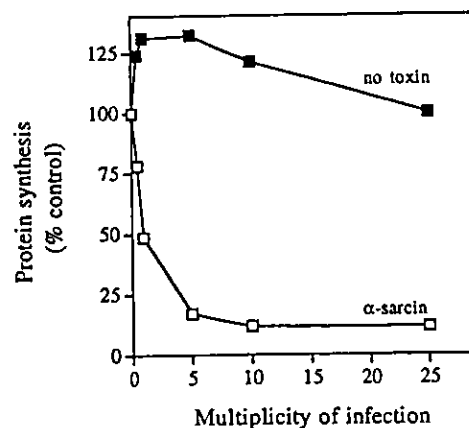


FIG. 2. Cell permeabilization induced by rotavirus is dose dependent. MA104 cells in 96-well plates were infected with the indicated MOI of trypsin-activated RRV virus in the presence or absence of 7.5 μM α -sarcin. Cells were then labeled, and the radioactivity in the TCA-precipitable material was determined as described in Materials and Methods. Data are expressed as a percentage of the ³⁵S incorporation of control cells mock infected in the absence of α -sarcin. The values represent the means for duplicate wells.

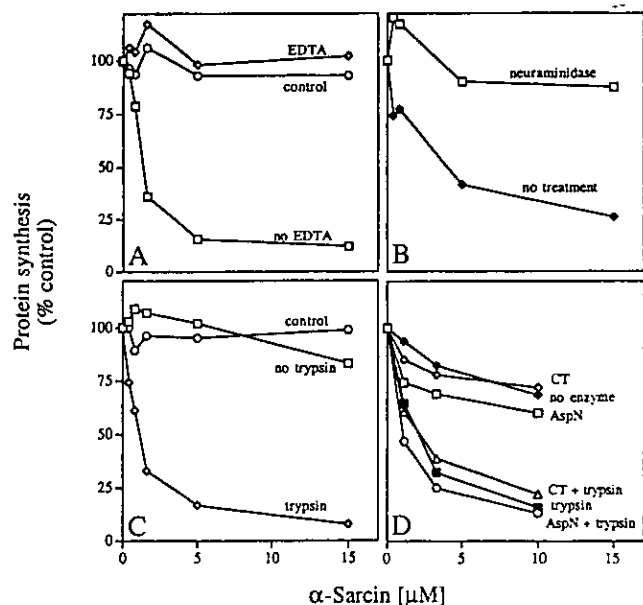


FIG. 3. Coentry of α -sarcin is mediated by infectious rotavirus. (A) MA104 cells in 96-well plates were infected with 10 FFU of trypsin-treated RRV virus per cell (no EDTA) or with an identical volume of the same RRV virus preparation treated with EDTA (EDTA) as described in Materials and Methods; mock-infected cells with MEM containing EDTA served as the control. (B) MA104 cells in 96-well plates were either not incubated or incubated with 20 mU of *A. ureafaciens* neuraminidase per ml for 1 h at 37°C. After this treatment, the cells were washed and infected with 10 FFU of trypsin-activated RRV virus per ml. (C) MA104 cells in 96-well plates were infected either with a preparation of RRV virus which was propagated in the absence of trypsin (no trypsin) or with an equivalent volume of the same virus preparation which was trypsin activated in vitro (trypsin) and contained 10 FFU/cell: control cells were mock infected with MEM containing trypsin. (D) MA104 cells in 96-well plates were infected with rotavirus SA114S which was propagated in the absence of trypsin (no enzyme) or digested with 10 μ g of trypsin per ml (trypsin), 1 μ g of *AspN* per ml (*AspN*), or 2 μ g of α -chymotrypsin per ml (CT) for 30 min at 37°C. Half of the *AspN*- and α -chymotrypsin-treated viruses were further treated with 10 μ g of trypsin per ml for 30 min at 37°C (*AspN* + trypsin and CT + trypsin, respectively). These protease-treated viruses were used in a permeabilization assay with 10 FFU of trypsin-treated SA114S virus per cell or the equivalent amount (by volume) of all other virus preparations. For all the conditions described above, α -sarcin was added together with the virus at the indicated concentrations. After 1 h of adsorption at 37°C, the virus and the toxin were removed and fresh serum-free MEM was added for 30 min. The cells were then labeled with EXPRE³⁵S for 1 h, and the radioactivity present in the TCA-precipitable material was estimated. Data are expressed as a percentage of the ³⁵S incorporation of control cells infected under the same conditions as the experimental cells, but in the absence of toxin. The values represent the means for duplicate wells.

had a 50-fold-lower titer than the trypsin-treated virus (5×10^5 FFU/ml versus 2.5×10^7 FFU/ml). When equal amounts by volume of trypsin-cleaved virus (MOI, 10) and uncleaved virus were tested in a permeabilization assay, the trypsin-treated virus effectively promoted the coentry of α -sarcin, reducing the incorporation of ³⁵S-labeled amino acids into proteins to about 10% that in control cells infected in the absence of α -sarcin (Fig. 3C). The slight permeabilization induced by the untreated virus was probably due to a small fraction of viral particles with an already cleaved VP4 protein.

We recently showed that treatment of simian rotavirus SA114S with proteases different from trypsin, which cleave either at only one of the three trypsin cleavage sites (protease *AspN* cleaves SA114S VP4 at the Arg-241/Asp-242 peptide bond) or near those sites (α -chymotrypsin cleaves at Tyr-246), does not significantly increase the infectivity of the virus, although such treatment generates VP8 and VP5 polypeptide cleavage products very similar to those obtained with trypsin

(3). To test if the permeabilization of cells to α -sarcin was also dependent on the precise proteolytic cleavage of the virus spike protein, rotavirus SA114S with uncleaved VP4 was prepared and incubated in vitro with α -chymotrypsin or *AspN*. Aliquots of the virus preparations cleaved with these proteases were further incubated with trypsin, treatment that has been shown to rescue the infectivity of the otherwise poorly infectious virus (3). Virus incubated with either α -chymotrypsin or *AspN* behaved like non-trypsin-treated virus; both reduced protein synthesis to approximately 75% that in control cells (Fig. 3D). As occurs with infectivity, the virus samples that were further treated with trypsin permeabilized cells to α -sarcin to a level similar to that obtained with the virus samples originally activated with trypsin. These data show that for the cells to become permeable to the toxin, virus not only must attach to but also must penetrate the cell.

(iv) Effect of virus-neutralizing antibodies. To further confirm that the permeabilization of the cells to α -sarcin was due to rotavirus entry, we tested a panel of neutralizing and non-neutralizing MABs directed to both surface proteins of rotavirus RRV. Incubation of the virus with neutralizing MABs directed either at the VP8 (MABs M11, M14, 1A9, and 7A12) or VP5 (MAB 2G4) domains of VP4 or at VP7 (MAB 159) blocked the permeabilization of the cells to α -sarcin (Fig. 4). On the other hand, incubation of the virus with nonneutralizing MABs directed at VP7 (MAB 129/60), VP5 (MAB HS2), or inner capsid protein VP6 (MAB 255/60) did not prevent the inhibition of cellular protein synthesis caused by α -sarcin. The lower level at which MAB M11 blocked the coentry of α -sarcin most probably reflects its low neutralization titer (1:400) compared to those of the other neutralizing MABs employed (1:3,200 to 1:25,600; see Materials and Methods). Since it has been shown that MABs directed at VP8 neutralize RRV by preventing its binding to the cell, while MABs directed at VP5 and VP7 do not affect RRV binding to the cell but rather inhibit virus entry at a postattachment step (40), these data suggest a correlation between the entry of α -sarcin and virus penetration.

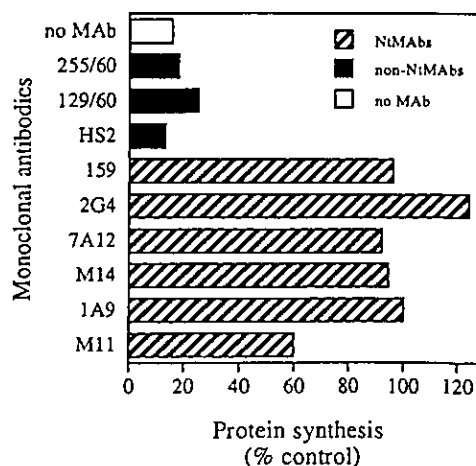


FIG. 4. Permeabilization of MA104 cells to α -sarcin is inhibited by neutralizing MABs (N1MABs). Trypsin-activated RRV virus (10 FFU/cell) was incubated for 1 h at 37°C with a 1:100 dilution of ascitic fluid containing the indicated MABs, except for MAB 2G4, which was used at a 1:150 dilution. After incubation with the MABs, the virus was adsorbed to MA104 cell monolayers in 96-well plates in the presence of 15 μ M α -sarcin. The cells were labeled and processed as described in Materials and Methods. Data are expressed as a percentage of the ³⁵S incorporation of control cells infected under the same conditions but in the absence of α -sarcin. The values represent the means for duplicate wells.

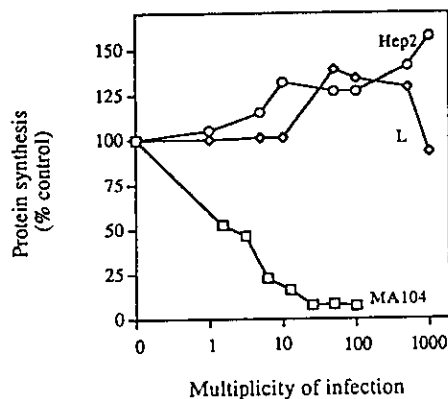


FIG. 5. Coentry of α -sarcin correlates with the cell specificity of rotavirus infection. MA104, HEp-2, and L cells in 96-well plates were infected with the indicated amounts of trypsin-activated RRV virus (infectious titer determined on MA104 cells) in the presence of 10 μ M (for HEp-2 and MA104 cells) or 0.1 μ M (for L cells) α -sarcin. The concentration of α -sarcin used for L cells was lower than that used for the other cell lines since L cells are more susceptible to the toxins (23) (data not shown). The cells were labeled and processed as described in Materials and Methods. Data are expressed as a percentage of the 35 S incorporation of control cells mock infected in the presence of α -sarcin. The values represent the means for duplicate wells.

Coentry of α -sarcin correlates with the cell specificity of rotavirus infection. Rotaviruses bind to a wide variety of cell types, although they productively infect only a subset of these cells (5). To test the specificity of the rotavirus-induced cell permeabilization, we determined if two cell lines (HEp-2 and L cells) that are poorly permissive for rotavirus infection could become permeable to the toxin when incubated with the virus. These cell lines have been shown to effectively bind rotavirus, although they are approximately 1,000 times less susceptible than MA104 cells to virus infection (data not shown; see also reference 4). The block in infectivity seems to be, at least for L cells, at the level of penetration, since liposome-mediated transfection of the virus into these cells results in efficient viral replication (5). Various amounts of RRV virus were added to either L or HEp-2 cells in the presence of α -sarcin. The addition of up to 1,000 FFU/cell (infectious titer determined on MA104 cells) did not permeabilize HEp-2 or L cells, while MA104 cells became almost totally permeabilized at an MOI of 10 (Fig. 5). These results support the specificity of the virus-cell interaction that leads to the entry of α -sarcin and the correlation between virus penetration and the entry of toxin.

Entry of α -sarcin is concomitant with virus entry. To study if the early membrane permeabilization of MA104 cells to α -sarcin is concomitant with virus entry or if the penetration of the virus leaves the cells permeable for some time, the effect on protein synthesis of adding α -sarcin at different times postinfection was determined. In this experiment, cells were infected with 10 FFU of RRV virus per cell for 30 min at 37°C, the unbound virus was removed, and the cells were either incubated or not incubated with rotavirus-neutralizing MAb 159 for 15 min at 37°C. This MAb has been shown to efficiently neutralize virus already attached to the cell surface (27). After the neutralization step, the toxin was added at different times for a period of 30 min, and the cells were labeled with 35 S-amino acids for 1 h and processed as described in Materials and Methods. Time zero was arbitrarily set at the end of the neutralization step. When no neutralizing MAb was added, the addition of α -sarcin completely prevented the synthesis of proteins, and the toxin was able to exert its inhibitory effect even when added 60 min after the neutralization step (Fig. 6). When

α -sarcin was added at time 120 min, it no longer prevented the synthesis of proteins, and some of the viral polypeptides were readily detected. In contrast, when the virus on the surface of the cell was neutralized with MAb 159, α -sarcin did not significantly affect protein synthesis, even when added at time zero, indicating that its entry was prevented. In control experiments, in which α -sarcin was not added, the addition of a neutralizing MAb caused a delay in the synthesis of viral proteins with respect to controls without MAb treatment, in which some viral proteins could be distinguished even at time zero. These results suggest that the entry of toxin is simultaneous or very close in time to the entry of virus and also indicate that when not neutralized, infectious RRV particles continue to enter the cell for as long as 60 min after adsorption at 37°C.

Coentry of α -sarcin is not affected by inhibitors of endocytosis. Rotavirus particles have been reported to enter the cell by both direct cell membrane penetration and receptor-mediated endocytosis (20, 27, 46, 47). Although the available evidence is more compatible with the hypothesis that infectious particles enter the cell by direct penetration, some debate still exists as to whether the infectious virus cannot use the endocytic route. To determine if the internalization of α -sarcin is mediated by the virus that enters the cell through the endocytic route, we tested the effect of dansylcadaverine and cytochalasin D on the permeabilization of cells to toxin. Under the conditions assayed, neither drug affected the coentry of α -sarcin, and as previously reported, these drugs did not have a significant effect on the infectivity of rotavirus (Table 1). In contrast, reovirus infectivity was decreased by 76 and 92% when the cells were incubated with 20 μ M cytochalasin D and 2 mM dansylcadaverine, respectively.

Rotavirus infection and coentry of α -sarcin do not depend on the activity of the vacuolar proton-ATPase. It has recently been reported that inhibitors of the vacuolar proton-ATPase, such as BFLA1, block infection by animal viruses that enter the cell through receptor-mediated endocytosis and require an acidic endosomal pH or a proton gradient across the membrane of the endocytic vesicle (7, 37). Since the potential role of such a proton gradient for rotavirus infection has not been evaluated, we determined the effect of BFLA1 on the infectivity of RRV virus and the coentry of α -sarcin. The addition of BFLA1 to MA104 cells at concentrations of up to 8 μ M did not modify the infectivity of RRV (Table 1), while it has been reported that the drug completely blocks the infectivity of reovirus type 1 at 5 μ M (21) (Table 1). Similarly, incubation of MA104 cells with 4 μ M BFLA1 did not prevent the arrest of protein synthesis caused by α -sarcin in the presence of RRV (Fig. 7), suggesting that the entry of both virus and α -sarcin is independent of the activity of the vacuolar proton-ATPase.

Increases in the $[Ca^{2+}]_i$ do not affect rotavirus uncoating. We investigated if increases in the $[Ca^{2+}]_i$ alter the penetration and uncoating of the virus and/or the coentry of α -sarcin. For this, three chemicals known to raise the $[Ca^{2+}]_i$ were used, the calcium ionophores A23187 and ionomycin and the specific inhibitor of the endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} -ATPase pump, thapsigargin.

In toxin permeabilization assays, MA104 cells were preincubated for 5 min with 8 μ M ionomycin or 2 μ M A23187 or for 15 min with 1 μ M thapsigargin, and the drug concentrations were maintained during the virus adsorption period of 60 min at 37°C. Under these conditions, the drugs did not prevent the arrest in protein synthesis caused by α -sarcin in the presence of RRV virus (Fig. 8). The total incorporation of 35 S-amino acids in control cells treated with ionomycin or thapsigargin in the presence or absence of virus was very similar to that observed in cells not treated with the drugs. In contrast, treatment of the

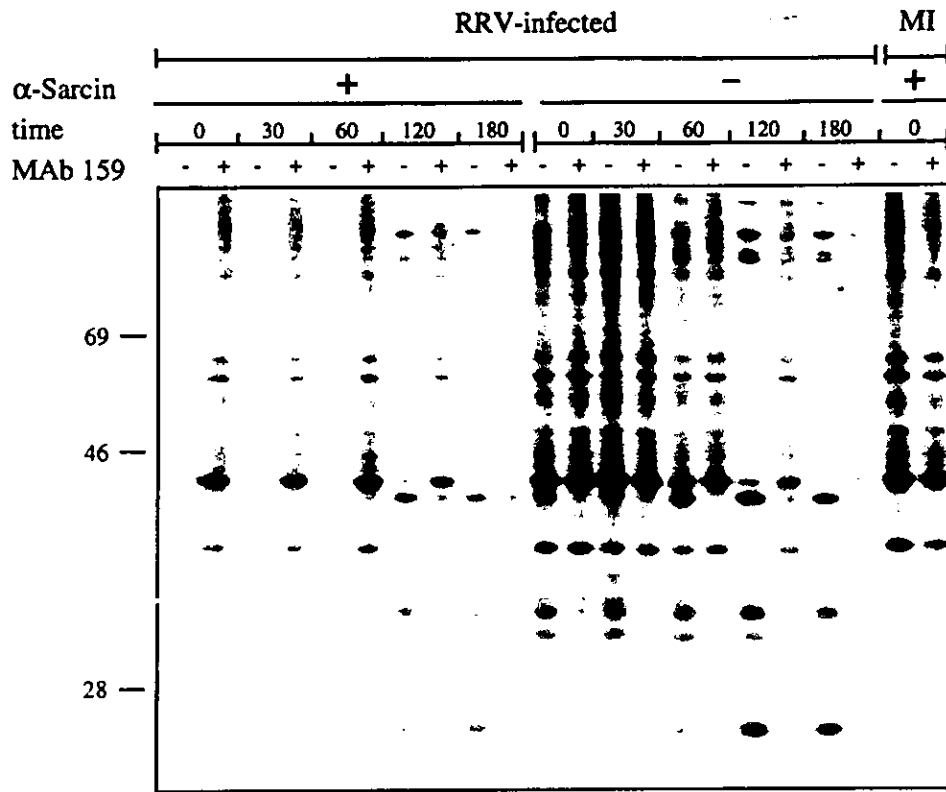


FIG. 6. Entry of α -sarcin is concomitant with virus entry. MA104 cells in 24-well plates were mock infected (MI) or infected with trypsin-activated RRV virus (10 FFU/cell) for 30 min at 37°C. After this time, the unbound virus was removed and MAb 159 (diluted 1:2,000) was added (or not) for 15 min. After removal of excess antibody (which was set as time zero), 7.5 μ M α -sarcin was added (or not) at different times postneutralization for 30 min. The cells were labeled and processed as described in Materials and Methods, and total protein synthesis was analyzed by SDS-PAGE and fluorography.

cells with the ionophore A23187 resulted in a decrease in the incorporation of 35 S-amino acids of about 50% compared to that in untreated cells. Nevertheless, it was possible to observe the arrest in protein synthesis caused by the addition of α -sarcin and virus. The addition of 3 μ M ionomycin to fura-2-loaded MA104 cells caused an \sim 3.8-fold increase in the $[Ca^{2+}]_i$. The mean basal $[Ca^{2+}]_i \pm$ the standard deviation was found to be 280 ± 63 nM, while the $[Ca^{2+}]_i$ after the addition of ionomycin was $1,065 \pm 95$ nM. The $[Ca^{2+}]_i$ in cells treated with either A23187 or thapsigargin was not determined, but for the latter drug, it has been reported that its addition to MA104 cells raises the $[Ca^{2+}]_i$ to levels above the basal concentration (34). Taken together, these results indicate that the coentry of toxin is not affected by increases in the $[Ca^{2+}]_i$.

Since the coentry of α -sarcin did not seem to be affected by the increase in the $[Ca^{2+}]_i$, we studied the effect of the ionophores and thapsigargin on the synthesis of viral proteins. For this purpose, MA104 cells were preincubated for 5 min with 8 μ M ionomycin or 2 μ M A23187 or for 15 min with 0.5 μ M thapsigargin and then infected with 10 FFU of RRV virus; the drug concentrations were maintained during the 60-min adsorption period. The unbound virus was removed, and the cells were incubated with neutralizing MAb 159 for 15 min at 37°C. This neutralization step was included to rule out the possibility that the viral protein synthesis detected was due to virus that remained attached to the cell surface and that entered the cell after the drugs were washed away from the medium. At 3 h after the neutralization step, the cells were labeled with 35 S-amino acids for 1 h and processed for SDS-PAGE as described in Materials and Methods. At 4 h postinfection, the synthesis

of viral proteins in the presence of ionomycin, A23187, or thapsigargin could be readily detected at levels similar to those in cells infected in the absence of the drugs. In cells treated with A23187, the total synthesis of proteins was reduced; however, it was possible to detect the synthesis of viral proteins in cells infected in the presence of this ionophore (Fig. 9). We did

TABLE 1. Effect of inhibitors of endocytosis and BFLA1 on virus infectivity and α -sarcin coentry

Drug and concn	Rotavirus RRV		Reovirus type 1 % infectivity ^c
	% Infectivity ^a	% α -Sarcin coentry ^b	
BFLA1 (μ M)			
2	94	20	ND ^c
4	96	18	ND
5	ND	ND	<0.01
Cytochalasin D (μ M)			
1	102	8	49
10	97	6	20
20	94	ND	24
Dansylcadaverine (mM)			
0.2	108	23	48
2	100	23	8

^a Expressed as a percentage of the FFU observed in control cells infected in the absence of drugs.

^b 35 S incorporation of cells incubated with the indicated drugs in the presence of 10 μ M α -sarcin, expressed as a percentage of the 35 S incorporation of control cells incubated with the drugs but not the toxin.

^c ND, not determined.

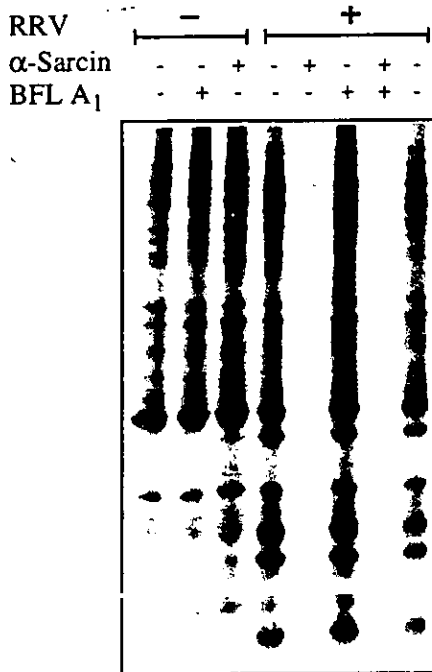


FIG. 7. Coentry of α-sarcin is not affected by BFLA1. MA104 cells in 24-well plates were preincubated for 30 min at 37°C with 4 μM BFLA1, and then 10 FFU of trypsin-activated RRV virus per cell containing or not containing 7.5 μM α-sarcin was added. After 30 min, BFLA1, α-sarcin, and virus were removed, and fresh serum-free MEM was added for 3 h. The cells were labeled for 1 h and processed as described in Materials and Methods, and total protein synthesis was analyzed by SDS-PAGE and fluorography.

not observe the altered electrophoretic migration of glycoproteins NSP4 and VP7 reported by Michelangeli et al. (34) for cells treated with thapsigargin. A possible explanation for this discrepancy might be the time of addition of the drug and the time of labeling and harvesting of the cells: they added thapsigargin 1 h postinfection and labeled the cells for 2 h beginning at 4 h postinfection.

The effect of the calcium ionophores and thapsigargin on the infectivity of the virus was also tested. The cells were infected with RRV virus in the presence of various concentrations of either ionophore or thapsigargin under the same conditions as those described above; at 12 h postinfection, the cells were fixed and immunostained for peroxidase forming units. The infectivity of RRV was not significantly affected by these compounds (data not shown). Although thapsigargin did not inhibit viral protein synthesis when present before and during the virus adsorption period, the yield of RRV after one replicative cycle carried out under these conditions decreased 3-fold: it decreased 20-fold (1.3×10^5 FFU/ml in untreated cells versus 6.8×10^3 FFU/ml in thapsigargin-treated cells) when the drug was left in the medium after the adsorption period. These findings are in agreement with previous reports (34). All of these results indicate that the increase in the $[Ca^{2+}]_i$ caused by ionomycin, A23187, and thapsigargin did not alter the uncoating of the virus, allowing the consequent genome transcription and synthesis of viral proteins.

DISCUSSION

In this work, we have shown that rotavirus infection of MA104 cells induces an early cell membrane permeabilization and promotes the coentry of toxins into the cell. This early

permeabilization event has been observed for several other nonenveloped and enveloped viruses, including poliovirus, reovirus, adenovirus, influenza virus, vesicular stomatitis virus, Semliki Forest virus, Sendai virus, and vaccinia virus (1, 18, 23, 25, 37). These viruses infect the cell using different mechanisms of internalization, suggesting that the early permeabilization of the cell membrane is a common event during virus infection (7, 8). Although the biological relevance, if any, of this phenomenon is not known, its study may provide information about the mechanism of virus entry.

A general method for studying virus-induced cell permeabilization has been to monitor the coentry with the virus of protein toxins that are potent inhibitors of the cell translation machinery. In the absence of a virus, these toxins are not able to cross the cell membrane because there are no specific receptors for them; thus, the entry of toxins is taken as a measure of the permeabilization induced by a virus. Although the mechanism by which this coentry occurs is not known, Carrasco (7, 8) has proposed a model in which a proton motive force is suggested to provide the energy for the entry of the virus, which might also be used for the virus-mediated translocation of the toxin.

In this study, we have shown that the rotavirus-mediated

- ▨ Control
- ▤ + Drug
- ▥ RRV + Drug
- ▧ RRV + Sarcin
- RRV + Drug + Sarcin

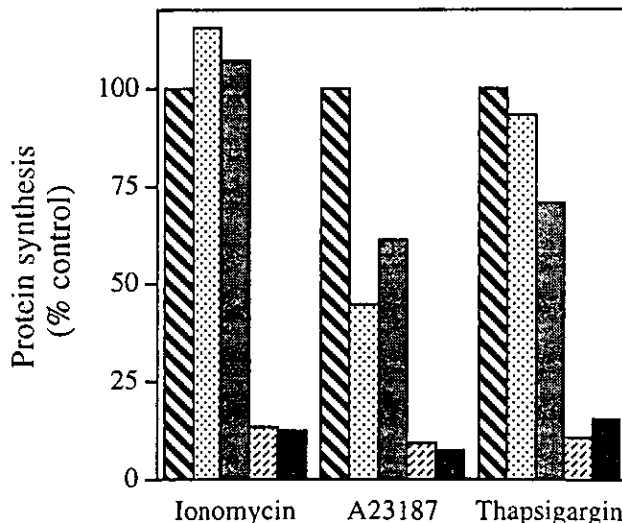


FIG. 8. Effect of the calcium ionophores ionomycin and A23187 and of thapsigargin on the coentry of α-sarcin. MA104 cells in 96-well plates were preincubated for 5 min with 8 μM ionomycin or 2 μM A23187 or for 15 min with 1 μM thapsigargin. The cells were then mock infected or infected with 10 FFU trypsin-activated RRV virus per cell in the presence or absence of 10 μM α-sarcin for 60 at 37°C; the appropriate drug concentrations were maintained during the adsorption period. The cells were labeled, and the radioactivity in the TCA-precipitable material was determined as described in Materials and Methods. Data are expressed as a percentage of the ³⁵S incorporation of control cells mock infected in the absence of α-sarcin and in the absence of drug (Control). The values represent the means for triplicate wells.

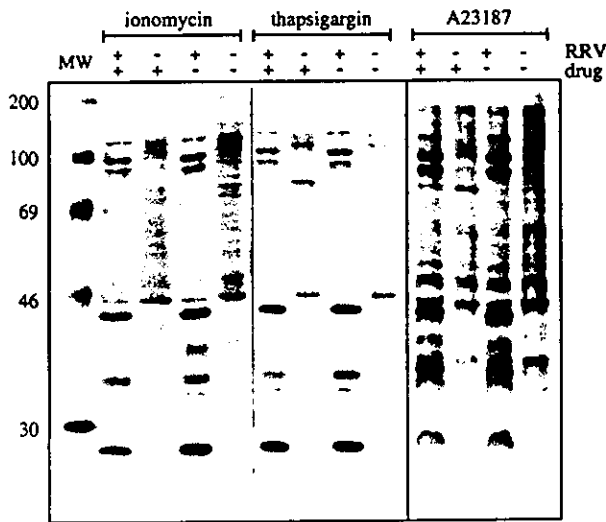


FIG. 9. Onset of viral protein synthesis is not blocked by A23187, ionomycin, or thapsigargin. MA104 cells in 24-well plates were preincubated at 37°C for 5 min with 0 μ M ionomycin or 2 μ M A23187 or for 15 min with 0.5 μ M thapsigargin. The cells were then mock infected or infected with 10 FFU of trypsin-activated RRV virus per cell. The drugs were maintained at the same concentrations during the adsorption period of 60 min at 37°C. After this period, the unbound virus was removed and MAb 159 (diluted 1:2,000) was added for 15 min at 37°C. After the excess antibody was removed, fresh serum-free MEM was added for 3 h, and the cells were labeled for 1 h and processed as described in Materials and Methods. Total protein synthesis was analyzed by SDS-PAGE and fluorography. The samples from the A23187 treatment were run in a separate gel, which was exposed six times longer than the gel for the samples from the other treatments. MW, molecular weight.

entry of α -sarcin into MA104 cells depends on infectious virus, since various treatments that are known to prevent rotavirus infection also prevent the coentry of the toxin. Of particular interest was the observation that untrypsinized virus (which binds to but does not penetrate the cell) or virus incubated with neutralizing MABs that inhibit a postattachment step did not promote the coentry of α -sarcin, suggesting that the permeabilization of the MA104 cell membrane is not induced by the attachment of the virus to the cell surface but by a post-binding step, presumably the penetration of infectious viral particles into the cell interior.

The permeabilization of the membrane was transient and was not detected 15 min after virus entry (the length of incubation with neutralizing MAB 159), suggesting that the potential pore or channel that might be formed during virus penetration seals quickly or, most likely, that the toxin enters the cell simultaneously with the virus, using either the same portal of entry or an independent mechanism coupled to penetration of the viral particle. The fact that neutralizing MABs to both VP4 and VP7 inhibited the coentry of toxin suggests that both viral surface polypeptides might have a relevant role in the permeabilization event and presumably in virus entry. Whatever the mechanism of this early membrane permeabilization, the virus-cell interaction that leads to it was shown to be specific, since L cells and HEp-2 cells were not permeabilized to α -sarcin with an MOI as high as 1,000 FFU/cell, a result which correlates with the fact that these cells are at least 1,000 times less susceptible than MA104 cells to rotavirus infection.

The mechanism by which rotaviruses are internalized into cells is still a matter of debate. Biochemical and morphological approaches have been used to address this question. Ultrastructural studies have suggested that rotavirus can enter the cell by both endocytosis and direct cell membrane penetration

(20, 27, 31, 39, 46, 47). However, the fact that rotavirus infection is not inhibited by lysosomotropic agents that raise the endosomal pH or by drugs that affect endocytosis or the intracellular transit of endocytic vesicles (4, 20, 27, 31) has been taken as evidence against this mode of entry or at least against the classical endocytic pathway that has been described for members of other virus families. Direct cell membrane penetration has thus been alternatively proposed as the mechanism of entry of rotaviruses. However, the evidence that supports this mechanism is rather indirect and mainly suggests that a nonendocytic route is used.

The study of the mode of entry of rotaviruses has been hampered by the lack of methods to specifically measure the entry of infectious particles. Electron microscopy and the escape of labeled virus from proteolytic digestion have been used to characterize this event (5, 31). The drawback of these methods, however, is that they cannot distinguish between the productive entry of infectious virus and the internalization of non-infectious physical particles. The inherent limitation of these methods is relevant for rotaviruses, since the ratio of infectious to noninfectious physical particles for RRV is typically about 1:100 (unpublished observations).

It has recently been reported that bovine rotavirus C486 and rotavirus RRV are able to cause fusion from without (FFWO) in MA104 cells pretreated with cholesterol (17). Also, it has been reported that bovine rotavirus RF is able to permeabilize liposomes as well as brush border-derived membrane vesicles (35, 41). These two phenomena were shown to be blocked by virus-neutralizing MABs and to be dependent on trypsinization of the viral particle, triple-layer virus, and the amount of virus used. Thus, these events were suggested to be related to the mechanism by which rotaviruses enter cells. There are, however, some discrepancies between the conditions in which these phenomena were detected and those required for the virus to infect the cell. First, EGTA-treated, noninfectious virus was shown to mediate both FFWO and the release of carboxyfluorescein (CF) from liposomes and vesicles. Second, FFWO and neutralization were shown to be distinct events, since MAB 7A12, which neutralizes virus infectivity, did not prevent the fusion event, while nonneutralizing MAB M60, directed at VP7, did. Third, the CF release induced by rotavirus RF was inhibited by calcium at concentrations at which the virus is fully infectious. Fourth, liposomes and membrane vesicles from diverse biological origins were all permeabilized by rotavirus RF. Although the susceptibility to rotavirus infection of the cells used to obtain the vesicles was not reported, their general permeabilization, together with the fact that liposomes were also permeabilized, suggests the lack of specificity of the virus-vesicle interaction that promotes the CF release. These discrepancies were not observed in the cell membrane permeabilization to α -sarcin described in this work.

It has recently been shown that BFLA1 and concanamycin A, selective inhibitors of the endosomal proton-ATPase, strongly block the cell entry of animal viruses that require either an endosomal acidic pH or a proton gradient to infect cells (8, 26). In the case of poliovirus, cell infection is not inhibited by BFLA1, although the virus-induced coentry of α -sarcin is potently blocked by this antibiotic, indicating that an active vacuolar proton-ATPase is necessary for the permeabilization event (36). Therefore, even though previous studies have shown that rotaviruses do not require a low-pH step to infect the cell, it was of interest to study if the rotavirus-mediated delivery of toxin depended on the activity of the vacuolar proton-ATPase. Neither the infectivity of rotavirus nor the coentry of α -sarcin was found to be affected by BFLA1, suggesting that rotavirus entry and the cotranslocation of α -

sarcin are independent of both the intraendosomal acidic pH and the proton gradient across the endosomal membrane. Of interest, other viruses not affected by BFLA1 are Sendai virus, which enters the cell by fusion of its envelope with the plasma membrane (37), and the infectious subviral particles of reovirus, which have been proposed to enter the cell by direct plasma membrane penetration (23).

At some point during the process of entry of rotaviruses into the cell, the viral transcriptase is activated and the virus genome is transcribed. In vitro the transcriptase activity is observed when the surface proteins VP4 and VP7 are released from the mature triple-layer viral particles by treatment with calcium-chelating agents, converting them into double-layer particles. In vivo, it is not clear whether the viruses become uncoated during the penetration step or once they have reached the cytoplasmic milieu. Fukuhara et al. (20) have reported that during penetration of the human rotavirus strain KUN, VP4 and VP7 remain bound to the surface of the cell, in the extracellular space, while only double-layer particles gain access to the cell cytoplasm. In contrast, Ludert et al. (31) found that treatment of MA104 cells with the calcium ionophore A23187 to increase the $[Ca^{2+}]_i$ prevented the uncoating of porcine rotavirus OSU and thus suggested that the low $[Ca^{2+}]_i$ was responsible for the virus uncoating.

In this work, we tested the effect of three compounds that raise the $[Ca^{2+}]_i$ on the penetration and uncoating of rotaviruses. These drugs alter the Ca^{2+} homeostasis of the cell by different mechanisms. A23187 and ionomycin are ionophores that transport Ca^{2+} across biological membranes, including the cytoplasmic, ER, and mitochondrial membranes; in the presence of extracellular Ca^{2+} , the increase in the $[Ca^{2+}]_i$ is mainly due to an influx of Ca^{2+} from the extracellular space. Thapsigargin, on the other hand, is a specific inhibitor of the ER Ca^{2+} -ATPase pump; when this pump is inhibited, the Ca^{2+} that leaks from the ER is not resequenced and accumulates in the cytosol (48, 49). The treatment of MA104 cells with these drugs did not affect the entry of infectious RRV virus or the onset of viral protein synthesis, indicating that the low $[Ca^{2+}]_i$ is not directly responsible for the uncoating of the triple-layer particles.

In our experiments, the treatment of cells with A23187 at concentrations similar to those reported by Ludert et al. (31) resulted in a reduction in total cellular protein synthesis (about 50% of that in control, untreated cells). Nonetheless, with these conditions, we were able to detect the coentry of α -sarcin when the cells were infected with RRV. Also, we detected the synthesis of viral proteins, although at lower levels according to the reduced translation capacity of the A23187-treated cells, suggesting that the virus was able to enter the cells and to initiate the transcription-translation cycle. The discrepancy between our results and those previously reported by Ludert et al. (31) might be due to the fact that unlike us, they did not look for infectious virus, only for physical particles. It is possible that the majority of the triple-layer particles that they detected were virions that remained associated with the cell surface of the A23187-treated cells and that were equivocally scored as intracellular triple-layer virions. We looked for infectious virus, which represents a small proportion and the biologically relevant fraction of the total input virus.

Our finding that the low $[Ca^{2+}]_i$ does not seem to be the factor that triggers the uncoating of the virus is in agreement with the observations made by Ruiz et al. (42) and Gajardo et al. (22), who reported that the amount of Ca^{2+} required to solubilize the surface proteins in vitro varied depending on the rotavirus strain. For SA11 and RRV viruses, a Ca^{2+} concentration as low as 38 nM is required to convert triple-layer to

double-layer particles; this concentration of Ca^{2+} is clearly lower than the basal $[Ca^{2+}]_i$ of MA104 cells (this work; 34). It is clear that the virus must become uncoated to activate the viral transcriptase, but the effector that triggers this uncoating has yet to be determined.

Recently, Dong et al. (11) reported that NSP4 added exogenously to HT29 cells mobilizes $[Ca^{2+}]_i$ through receptor-mediated phospholipase C activation and IP3 production. They hypothesized that after being released from virus-infected cells, NSP4 may bind to an unidentified molecule on the plasma membrane surface of neighboring uninfected cells to mobilize $[Ca^{2+}]_i$. Our finding that an increase in the $[Ca^{2+}]_i$ does not block the initial steps of virus infection is compatible with this hypothesis.

Although most of the available evidence is compatible with rotaviruses entering the cell by penetration at the plasma membrane level, further studies are needed to unequivocally establish the entry pathway of these viruses. In this regard, the α -sarcin coentry assay should be a valuable tool for dissecting this pathway and establishing the role of the viral proteins involved in the process.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to H. B. Greenberg for kindly providing the MAbs used in this work and to A. Darszon and E. Rodriguez for their help with the calcium determinations.

This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico, IN207496 from DGAPA-UNAM, and ERB3514PL950019 from the INCO Programme of the European Community.

REFERENCES

- Almela, M. J., M. E. González, and L. Carrasco. 1991. Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. *J. Virol.* 65:2572-2577.
- Anthony, I. D., S. Bullivant, S. Dayal, A. R. Bellamy, and J. A. Berriman. 1991. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. *J. Virol.* 65:4334-4340.
- Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70:5832-5839.
- Bass, D. M., M. Baylor, C. Chen, and U. Upadhyayula. 1995. Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology* 212:429-437.
- Bass, D. M., M. R. Baylor, C. Chen, E. M. Mackow, M. Bremont, and H. B. Greenberg. 1992. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* 90:2313-2320.
- Brigotti, M., F. Rambelli, M. Zamboni, L. Montanaro, and S. Sperti. 1989. Effect of α -sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* 257:723-727.
- Carrasco, L. 1994. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Lett.* 350:151-154.
- Carrasco, L. 1995. Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv. Virus Res.* 45:61-112.
- Clark, S. M., J. R. Roth, M. L. Clark, B. B. Barnett, and R. S. Spendlove. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39:816-822.
- Cohen, J., J. Laporte, A. Charpilienne, and R. Scherrer. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60:177-186.
- Dong, Y., C. Q.-Y. Zeng, J. M. Ball, M. K. Estes, and A. P. Morris. 1997. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3960-3965.
- Endo, Y., and I. G. Wool. 1982. The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosome. *J. Biol. Chem.* 257:9054-9060.
- Espejo, R., E. Martínez, S. López, and O. Muñoz. 1980. Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect. Immun.* 28:230-237.
- Espejo, R. T., S. López, and C. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156-160.
- Estes, M. K., and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53:410-449.
- Estes, M. K., D. Y. Graham, and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39:879-888.

17. Falconer, M. M., J. M. Gilbert, A. M. Roper, H. B. Greenberg, and J. S. Gavora. 1995. Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. *J. Virol.* 69:5582-5591.
18. Fernández-Puentes, C., and L. Carrasco. 1980. Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* 20:769-775.
19. Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno. 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology* 172:196-205.
20. Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka, and T. Konno. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62:2209-2218.
21. Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka, T. Konno, and N. Ishida. 1987. Evidence for endocytosis-independent infection by human rotavirus. *Arch. Virol.* 97:93-99.
22. Gajardo, R., P. Vende, D. Poncet, and J. Cohen. 1997. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J. Virol.* 71:2211-2216.
23. García, M. C., R. Guinea, J. Benavente, and L. Carrasco. 1996. The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. *J. Virol.* 70:576-579.
24. Guerrero, A., and A. Darszon. 1989. Egg jelly triggers a calcium influx which inactivates and is inhibited by calmodulin antagonists in the sea urchin sperm. *Biochim. Biophys. Acta* 980:109-116.
25. Guinea, R., and L. Carrasco. 1995. Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. *J. Virol.* 69:2306-2312.
26. Irurzun, A., J.-L. Nieva, and L. Carrasco. 1997. Entry of Semliki Forest virus into cells: effects of concanamycin A and nigericin on viral membrane fusion and infection. *Virology* 227:488-492.
27. Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62:1136-1144.
28. Keljo, D. J., and A. K. Smith. 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7:249-256.
29. Lizano, M., S. López, and C. F. Arias. 1991. The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. *J. Virol.* 65:1383-1391.
30. López, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11-19.
31. Ludert, J. E., F. Michelangeli, F. Gil, F. Liprandi, and J. Esparza. 1987. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 27:95-101.
32. Méndez, E., C. F. Arias, and S. López. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67:5253-5259.
33. Méndez, E., C. F. Arias, and S. López. 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* 70:1218-1222.
34. Michelangeli, F., F. Liprandi, M. E. Chemello, M. Ciarlet, and M. C. Ruiz. 1995. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *J. Virol.* 69:3838-3847.
35. Nandi, P., A. Charpilienne, and J. Cohen. 1992. Interaction of rotavirus particles with liposomes. *J. Virol.* 66:3363-3367.
36. Pérez, L., and L. Carrasco. 1993. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J. Virol.* 67:4543-4548.
37. Pérez, L., and L. Carrasco. 1994. Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* 75:2595-2606.
38. Prasad, B. V., J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes, and W. Chiu. 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* 343:476-479.
39. Quan, C. M., and F. W. Doane. 1983. Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology* 20:223-231.
40. Ruggeri, F. M., and H. B. Greenberg. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* 65:2211-2219.
41. Ruiz, M. C., T. S. Alonso, A. Charpilienne, M. Vasseur, F. Michelangeli, J. Cohen, and F. Alvarado. 1994. Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J. Virol.* 68:4009-4016.
42. Ruiz, M. C., A. Charpilienne, F. Liprandi, R. M. Gajardo, F. Michelangeli, and J. Cohen. 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J. Virol.* 70:4877-4883.
43. Shahrahadi, M. S., L. A. Babiuk, and P. W. Lee. 1987. Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology* 159:102-111.
44. Shaw, A. L., R. Rothnagel, D. Chen, R. F. Ramig, W. Chiu, and B. V. Prasad. 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell* 74:693-701.
45. Spencer, E., and M. L. Arias. 1981. In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. Virol.* 40:1-10.
46. Suzuki, H., S. Kitaoka, T. Konno, T. Sato, and N. Ishida. 1985. Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch. Virol.* 85:25-34.
47. Suzuki, H., S. Kitaoka, T. Sato, T. Konno, Y. Iwasaki, Y. Numazaki, and N. Ishida. 1986. Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Arch. Virol.* 91:135-144.
48. Thastrup, O. 1990. Role of Ca²⁺-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions* 29:5-15.
49. Thastrup, O. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2466-2470.
50. Tsién, R. Y., T. Pozzan, and T. J. Rink. 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* 94:325-334.
51. Yolken, R. H., R. Willoughby, S. B. Wee, R. Miskuff, and S. Vonderfecht. 1987. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J. Clin. Invest.* 79:148-154.

RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL OBJETIVO I.3

OBTENCION DE PSEUDOPARTICULAS VIRALES.

Crawford y colaboradores utilizaron el baculovirus como sistema de expresión de proteínas heterólogas en células de insecto, y reportaron que la coexpresión de los genes que codifican para las proteínas estructurales de rotavirus VP2, VP6, VP7 y VP4, resultó en el ensamblaje de pseudo-partículas virales de rotavirus (VLP's) (Crawford *et al.*, 1994).

El sistema de expresión en baculovirus utiliza el promotor de la polihedrina que es muy fuerte y está activo en la fase tardía de la expresión de los genes virales (aproximadamente 18 - 72 hrs. post-infección). El gen de la polihedrina no es esencial para la replicación ó producción de virus extracelulares en cultivo, por lo tanto su eliminación ó sustitución por un gen heterólogo resulta en la producción de virus viables que no producen polihedrina. Los virus recombinantes se generan a partir de una doble recombinación entre secuencias homólogas presentes en el genoma del baculovirus y en el plásmido que se utiliza como vector de transferencia; el cual acarrea el gen cuyo producto se desea

sobre-expresar (Summers & Smith, 1987). Una de las ventajas de éste sistema es la producción abundante de las proteínas recombinantes, se estima que la polihedrina ó en su caso la proteína heteróloga pueden llegar a constituir hasta el 50% del total de la proteína celular; además de que las proteínas expresadas, contienen en la mayoría de los casos, las modificaciones postraduccionales en el sitio idéntico a su contraparte auténtica, lo que las hace estructural y funcionalmente similares (Summers & Smith, 1987).

Las VLP's de rotavirus producidas en éste sistema mantienen características morfológicas y funcionales similares a los virus nativos, reaccionan con anticuerpos neutralizantes y no-neutralizantes, inducen una buena respuesta inmune cuando se inoculan en ratones y pueden unirse a células en suspensión de manera específica (Crawford *et al.*, 1994). La Dra. M. K. Estes del Baylor College of Medicine, nos proporcionó los baculovirus recombinantes que codifican para las proteínas estructurales VP2 de la cepa de rotavirus bovino RF y las proteínas VP4, VP6 y VP7 de la cepa de rotavirus de simio SA11.

Dada la potencialidad que ofrece el sistema de VLP's para manipular *in vitro* los genes de las proteínas estructurales de rotavirus, nos propusimos determinar si las VLP's son capaces de penetrar a la célula y si ésta penetración es dependiente de VP4 y del corte con

tripsina, como ocurre en el virus. De ser así, ésta herramienta nos permitiría mutagenizar las regiones que creemos podrían estar involucradas en la penetración de los rotavirus.

El primer paso del trabajo con el sistema de baculovirus, fué establecer un cultivo en suspensión de la línea celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) bajo las condiciones previamente reportadas (Crawford *et al.*, 1994). La obtención de distintos tipos de VLP's, se realizó mediante coinfecciones combinatorias con cada uno de los baculovirus recombinantes que codifican para cada una de las proteínas estructurales de rotavirus. Para las coexpresiones, se crecieron de 200 a 300 ml de células Sf9 en frascos agitados hasta alcanzar una densidad celular promedio de 3×10^6 células/ml. Las células se infectaron con 5 partículas infecciosas de cada virus recombinante. Las combinaciones realizadas fueron: VP2/VP6, VP2/VP6/VP7 y VP2/VP6/VP7/VP4. Seis días post-infección, las partículas se purificaron del medio de cultivo por ultracentrifugación y gradientes en CsCl, posteriormente en cada lote de partículas se analizó la presencia de cada una de las proteínas estructurales en las VLP's por medio de geles de poliacrilamida-SDS y Western blot. La inmunotinción se realizó utilizando como primer anticuerpo un anticuerpo policlonal antirotavirus (α YM), y como segundo anticuerpo, un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa. La reacción de peroxidasa se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando luminol (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El Western blot de la figura 10 muestra una comparación entre los diferentes tipos de VLP's producidas. En ésta figura se puede observar la expresión de cada uno de los genes que se utilizaron para infectar las células de insecto, y su ensamblaje en los distintos tipos de partículas. La coexpresión de los genes que codifican para VP2 y VP6, resultó en la formación de VLP's 2/6 que como había sido reportado previamente, tienen características similares a los viriones de doble capa. La coinfección de células Sf9 con los virus que codifican para las proteínas VP2, VP6 y VP7, dió origen al ensamblaje de VLP's 2/6/7; si a ésta combinatoria le sumamos el gen 4, las partículas resultantes incorporaron la proteína VP4 en su estructura, dando origen a partículas 2/6/7/4 que semejan estructuralmente a viriones completos. Para evaluar la eficiencia de producción de VLP's, se realizó la cuantificación de proteínas de cada coinfección por el método de Bradford (Biorad) siguiendo las especificaciones del fabricante. El rendimiento varió entre cada experimento y de acuerdo a la composición proteínica de las VLP's; la producción promedio obtenida fué: VLP's 2/6, 215 ng; VLP's 2/6/7, 113 ng y VLP's 2/4/6/7, 60 ng por 10^6 células infectadas.

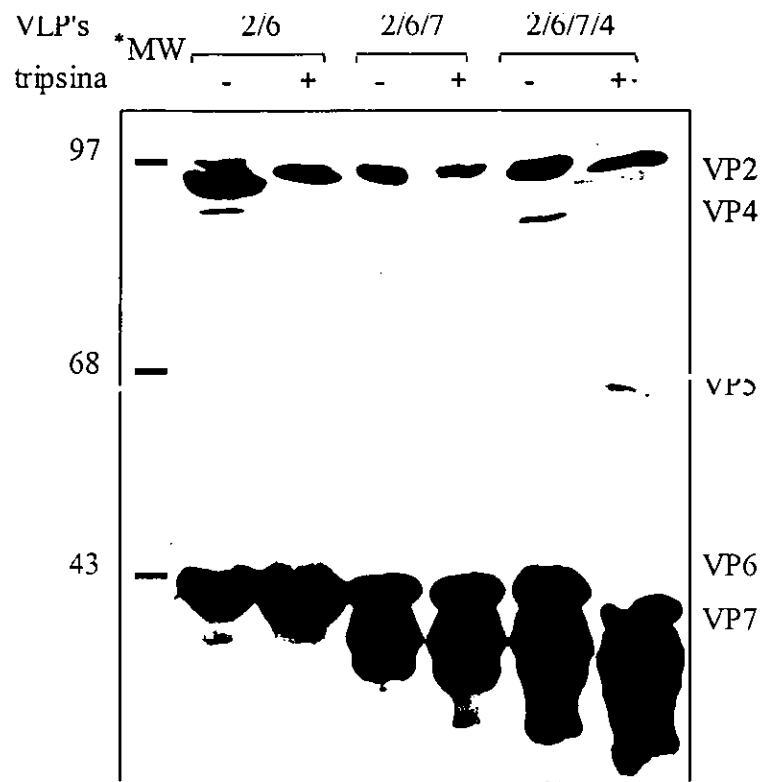


Figura 10. Caracterización de las diferentes preparaciones de VLP's de SA11 por Western blot. VLP's producidas en células de insecto y purificadas del medio de cultivo, fueron ó no tratadas con 10 µg/ml de tripsina por 30 mins. a 37 °C; posteriormente se sometieron a electroforésis en un gel 11 % acrilamida - 0.08% SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y la inmunotinción se realizó con el anticuerpo policlonal anti-rotavirus αYM, como segundo anticuerpo se utilizó anti Ig de conejo acoplado a peroxidasa. El complejo antígeno anticuerpo se reveló mediante quimioluminiscencia con luminol. Las proteínas virales están señaladas de acuerdo a su migración. * MW representa la posición de marcadores de peso molecular.

COENTRADA DE α -SARCINA EN CELULAS MA104 PROMOVIDA POR VLP'S.

Una vez estandarizada la producción de VLP's y dada su semejanza estructural con viriones de doble y triple capa, así como la habilidad de estas VLP's de unirse específicamente a células en suspensión (17), se evaluó su capacidad para promover la coentrada de α -sarcina en las células MA104. La cantidad de VLP's necesaria para un ensayo de permeabilización no pudo estimarse en base a focos infecciosos como lo hicimos con el virus (ver artículo anexo), esto se debe a que las VLP's carecen de genoma viral y no son infecciosas. Por lo tanto, se cuantificó la concentración de proteínas presente en 10 unidades formadoras de focos (10 uff) de rotavirus RRV purificado por gradiente de CsCl, y ésta se tomó como la concentración inicial para realizar una curva de permeabilización a α -sarcina inducida por VLP's.

Las distintas concentraciones de VLP's, se preincubaron 30 min. a 37 °C con 10 μ g/ml de tripsina en presencia de 1.25 μ g/ml de albúmina bovina y las VLP's procesadas se utilizaron para un ensayo de coentrada. Se utilizó BSA como acarreador para descartar la posibilidad de una degradación total de las VLP's por la tripsina. En la figura 11 se muestra una curva representativa de permeabilización a α -sarcina mediada por VLP's de distintas composiciones. Aquí se puede observar que las VLP's completas (2/6/7/4) inducen la coentrada de la toxina. Al igual que con el virus, la permeabilización es dosis dependiente, 500 ng de partículas 2/6/7/4 (equivalente a aproximadamente 10 uff de virus) promovieron la coentrada de α -sarcina, que disminuyó en un 20% la síntesis de proteínas celulares, alcanzándose una disminución del 70% con 2 μ g de VLP's.

En la misma figura también se puede observar que la permeabilización requiere de la presencia de la proteína VP4 ensamblada en la pseudo-partícula viral ya que las VLP's 2/6 ó las VLP's 2/6/7 fueron incapaces de inducir la coentrada de toxina. Aún a concentraciones de 2 μ g el nivel de 35 S incorporado se mantuvo alrededor del 100%. Estos resultados indican que las VLP's promueven la coentrada de α -sarcina y que ésta permeabilización es dependiente de VP4.

Para determinar si la permeabilización de las VLP's era dependiente del corte proteolítico de VP4 con tripsina, se realizó un ensayo de coentrada con los distintos tipos de partículas previamente tratadas ó no con tripsina. La activación se realizó durante 30 min. a

37 °C con 10 μ g de tripsina/ml, en presencia de 1.25 μ g/ml BSA. El Western blot de la fig. 10 confirma la especificidad del corte de VP4 con tripsina. En éstos experimentos se incluyó al virus RRV como control positivo de permeabilización (10 focos infecciosos por célula).

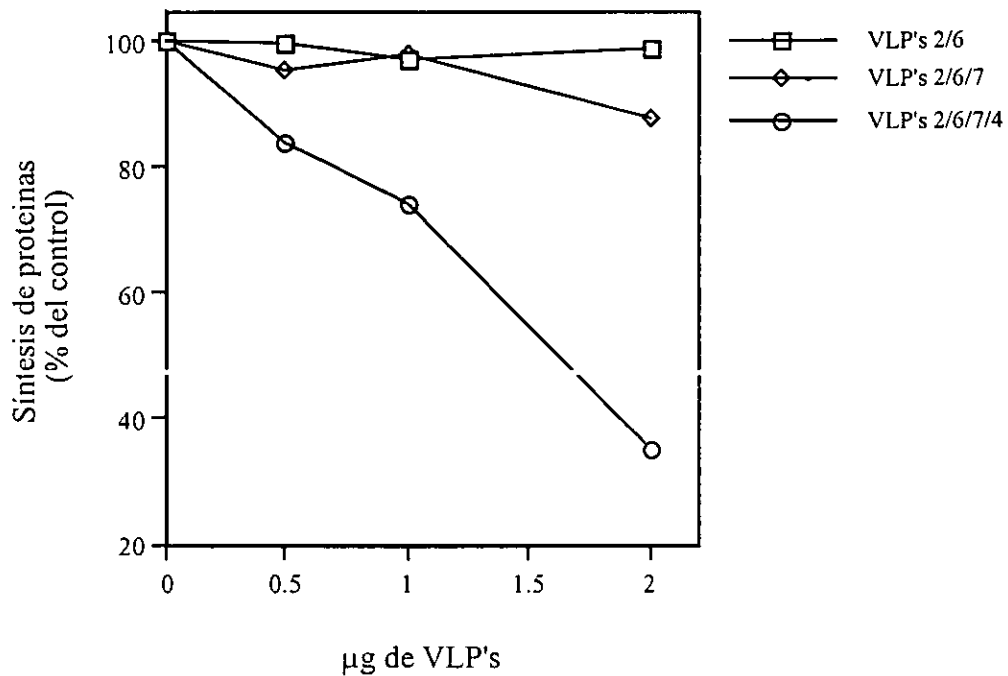


Figura 11. Permeabilización de células MA104 a a-sarcina mediada por VLP's. Concentraciones crecientes de las distintas VLP's (2/6, 2/6/7 ó 2/6/7/4) se activaron durante 30 mins. a 37 °C con 10 mg/ml de tripsina-DPCK (SIGMA) en presencia de 1.25 mg/ml de BSA. Posteriormente, se incubaron con una monocapa de células MA104 en presencia de 10 mM a-sarcina durante 1 hr. a 37 °C, el inóculo se retiró y se reemplazó con medio de cultivo fresco por un periodo adicional de 30 mins. Posteriormente, las células se marcaron metabólicamente con EXPRE35S35S por una hora a 37 °C y se procesaron como se describe en la sección de material y métodos del artículo anexo. Los datos se expresan como el porcentaje de 35S incorporado con respecto al control de células incubadas sin VLP's en presencia de a-sarcina.

Con los resultados de este ensayo se confirmó el papel fundamental de la VP4 en la permeabilización y se descartó la posibilidad de la permeabilización inespecífica por tripsina ó BSA, ya que las VLP's 2/6 y 2/6 7 con ó sin tripsina no inducen la coentrada de la toxina (figura 12). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, encontramos que la permeabilización de las VLP's 2/6/7/4 parece no depender del corte con tripsina, ya que en todos los ensayos realizados, las VLP's completas no cortadas con tripsina, también fueron capaces de promover la cointernalización de α -sarcina aunque en menor proporción. Las posibles explicaciones a este hallazgo son que la cantidad de VP4 ya cortada presente en la preparación, sea suficiente para promover la permeabilización de las células, y la otra posibilidad es que el no requerimiento al corte con tripsina refleja algún cambio conformacional en VP4 que está permitiéndoles a las VLP's interactuar con las células y promover la coentrada de la toxina directamente.

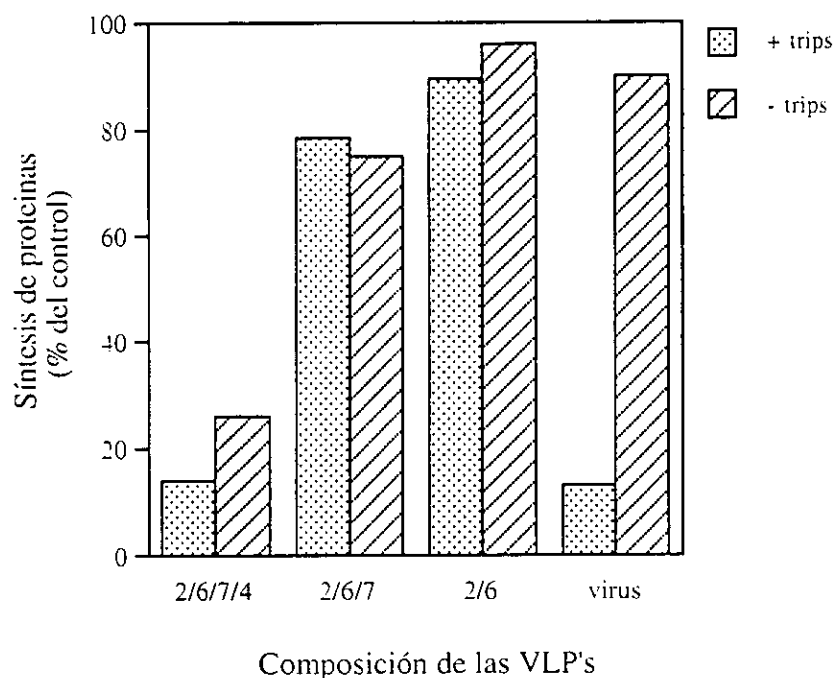


Figura 12. Efecto del corte con tripsina sobre la permeabilización de MA104 a α -sarcina mediada por VLP's. 3 μ g de VLP's completas ó 2 μ g de VLP's 2 6 7; y 10 uif/célula de RRV, se activaron ó no con 10 μ g/ml de tripsina durante 30 mins. y se añadieron junto con 10 μ M de α -sarcina a una monocapa de células MA104 para realizar un experimento de coentrada como se describe en la sección de material y métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de 35 S incorporado con respecto al control de células incubadas con la misma concentración de α -sarcina en presencia ó ausencia de tripsina. La gráfica muestra el promedio de dos experimentos independientes.

Para caracterizar la especificidad de la permeabilización observada, se realizaron ensayos de inhibición de la coentrada mediada por VLP's con anticuerpos que neutralizan ó no la infección de rotavirus, así como por el tratamiento de las células con neuraminidasa (NA). La preincubación de las VLP's con anticuerpos neutralizantes dirigidos contra VP5, VP8 ó VP7, así como el pretratamiento de las células con NA no inhibió la coentrada de las VLP's. Estos datos aunque no son concluyentes sugieren que posiblemente (como ya apuntaban los resultados anteriores, en los que la permeabilización promovida por las VLP's fué tripsina independiente), la conformación de las proteínas en las VLP's no sea la misma que presentan en el virión y que los epitopes que reconocen los anticuerpos no se encuentren expuestos ó en la conformación apropiada.

En conjunto, éstos resultados sugieren que pese a que la permeabilización promovida por VLP's es dependiente de VP4, pareciera que el plegamiento de las proteínas de capa externa ensambladas en el sistema de VLP's no mantienen la misma estructura que en el virus. Este cambio conformacional pudiera proporcionarles la estructura equivalente a la que se genera en el virus con el corte con tripsina, de tal manera que pueden interaccionar directamente con la molécula responsable de la penetración.

Durante el desarrollo de este proyecto de investigación, Fernando Hernández en nuestro laboratorio, estandarizó el sistema de ensamblaje de VLP's cuyas proteínas estructurales provienen de la cepa del rotavirus porcino YM, el ensamblaje de éstas partículas resultó ser más eficiente cuando se utilizó el baculovirus recombinante que codifica para la proteína VP2 de la cepa RF.

Dado que la permeabilización tripsina-independiente promovida por las VLP's de SA11 parece ser favorecida por algún cambio conformacional en alguna (s) de sus proteínas, analizamos si las VLP's de YM eran capaces de inducir la coentrada de α -sarcina y si ésta coentrada es dependiente de la activación proteolítica de VP4 con tripsina.

En la figura 13 se muestra una curva de permeabilización a α -sarcina mediada por VLP's de YM y SA11; así como el requerimiento del corte con tripsina para promover la coentrada. Aquí, podemos observar que las partículas de YM al igual que las de SA11 fueron capaces de promover la permeabilización a la toxina de una manera dosis dependiente. A diferencia de las VLP's de SA11, la coentrada de α -sarcina mediada por las partículas cuya proteína VP4 proviene de la cepa YM presentó una mejor dependencia de la activación

proteolítica con tripsina para permeabilizar. Este resultado refuerza la idea de que la permeabilización tripsina-independiente observada en las VLP's de SA11, y la falta de inhibición de la misma con anticuerpos neutralizantes se debe probablemente a un cambio conformacional en la estructura de las proteínas VP4 y VP7 de SA11, al encontrarse ensambladas en VLP's.

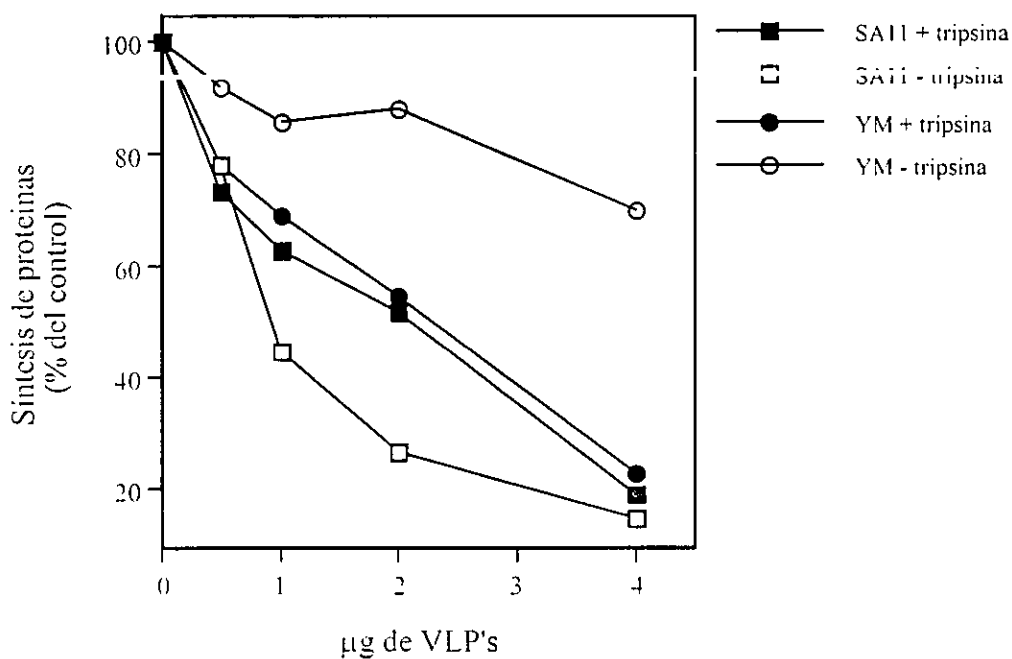


Figura 13. Coentrada de α -sarcina promovida por VLP's provenientes de las cepas YM y SA11. Distintas concentraciones de VLP's de YM ó SA11 fueron activadas ó no con tripsina en las condiciones descritas anteriormente y se agregaron a una monocapa de MA104 en presencia de 10 μ M α -sarcina. Posteriormente se realizó un ensayo de coentrada como se describe en material y métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de 35 S incorporado con respecto al control incubado bajo la misma concentración de α -sarcina pero en ausencia de VLP's. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes.

DISCUSSION

En este trabajo demostramos que durante los primeros eventos de la infección por el rotavirus RRV se promueve eficientemente la permeabilización de células MA104 a distintas toxinas como restrictocina, abrina A y α -sarcina.

Las toxinas inhiben en un 80%-100% la síntesis de proteínas celulares cuando se añaden simultáneamente con el virus, mientras que los niveles de síntesis de proteínas en ausencia de virus se mantienen alrededor del 90% con respecto al control. Estos resultados indican que las toxinas por sí solas son incapaces de translocarse a través de la membrana y que la permeabilización observada es debida a la interacción del rotavirus con la superficie celular.

De las tres toxinas probadas, α -sarcina mostró una dependencia más estricta a la presencia del virus para inducir la permeabilización, por lo que decidimos hacer la caracterización de la coentrada de macromoléculas promovida por rotavirus con ésta toxina.

La diversidad en el grado de respuesta con cada toxina puede atribuirse a diferencias en la eficiencia de cada una de ellas para cruzar la membrana. Abrina y restrictocina por su parte tienen cierto efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas, aún en ausencia del virus. Dicho efecto podría deberse, al menos para el caso de abrina, al mecanismo de acción de esta toxina. La abrina como se mencionó anteriormente, al igual que ciertas toxinas bacterianas (difteria) está compuesta por dos subunidades proteínicas (la subunidad de anclaje y la subunidad efectora); el reconocimiento de un receptor celular no identificado por la subunidad de anclaje favorece la translocación de la subunidad efectora al citoplasma celular donde ejerce su acción (Fernández-Puentes & Carrasco, 1980). Aunque nuestros experimentos se realizaron solo con la subunidad efectora de abrina (abrina A), no podemos descartar la posibilidad de que cierta fracción contaminante de la subunidad de anclaje, sea la responsable de la actividad inhibitoria en los rangos superiores a 100 nM.

La α -sarcina es una ribotoxina que actúa sobre la subunidad 60S del ribosoma eucarionte bloqueando su interacción con los factores de elongación de la maquinaria de traducción celular (Brigotti *et al.*, 1989, Endo & Wool, 1982). Hasta la fecha no se han descrito receptores membranales para α -sarcina, sin embargo ésta toxina puede interactuar de manera electrostática con fosfolípidos y dichas interacciones desestabilizan las vesículas lipídicas ocasionando la liberación del contenido intravesicular (Gasset *et al.*, 1995). Aunque la coentrada de la toxina en la línea celular MA104, claramente requiere de la presencia de

rotavirus, el 5-10% de inhibición en la síntesis de proteínas observado en algunos de los casos en ausencia de rotavirus, podría deberse a la interacción de α -sarcina con los lípidos de la membrana.

Un método utilizado para el estudio de la permeabilización promovida por virus, ha sido monitorear la coentrada de toxinas con la entrada del virus (Carrasco, 1994, Carrasco, 1995). Esta cointernalización parece ser un fenómeno generalizado, ya que se ha encontrado que virus que utilizan diferentes estrategias de penetración inducen la coentrada de toxinas y otras macromoléculas como plásmidos; esto incluye tanto a virus cubiertos con envoltura lipídica que generalmente ingresan a la célula por fusión ya sea a nivel de membrana plasmática ó endosomal (ej. virus vaccinia, Sendai y el virus Semliki Forest) (Fernández-Puentes & Carrasco, 1980, Pérez & Carrasco, 1994), y aquellos desprovistos de membrana que entran por endocitosis ó penetración directa como poliovirus, adenovirus y reovirus (Almela *et al.*, 1991, Fernández-Puentes & Carrasco, 1980, García *et al.*, 1996, Pérez & Carrasco, 1994).

Aunque se desconoce la relevancia biológica de ésta permeabilización temprana a toxinas (si es que tiene alguna), su estudio puede proveer información importante sobre los mecanismo de entrada a la célula de distintos virus.

No es claro el mecanismo molecular mediante el cual ocurre la permeabilización temprana de la membrana a toxinas. El modelo "protomotriz" propuesto por Carrasco y colaboradores (Carrasco, 1994, Carrasco, 1995) establece que el gradiente de pH generado en los endosomas por la ATPasa de protones vacuolar, se utiliza como fuente de energía y que las proteínas virales ó las subunidades de anclaje de las toxinas insertadas en la membrana, pueden acoplar la energía liberada por el movimiento de protones hacia el citoplasma en favor del gradiente, para la translocación del genoma viral (ó de las subunidades efectoras de las toxinas) en la misma dirección. Este modelo explica la translocación del genoma viral en aquellos virus cuyo mecanismo de entrada es por endocitosis y dependiente de pH; mientras que para los sistemas virales que entran de una manera independiente de pH, Carrasco y colaboradores propusieron al potencial de membrana, ó directamente la utilización de ATP como las fuentes de energía alternativas empleadas para internalizar el genoma (y las toxinas) al citosol (Carrasco, 1994).

Los resultados de este trabajo demostraron que la coentrada de α -sarcina mediada por rotavirus requiere del cumplimiento de cada uno de los primeros eventos en la ruta infecciosa del virus como adsorción y penetración.

La adsorción específica del rotavirus RRV a ácido siálico, que de antemano sabíamos que es necesaria para la infectividad, también fué indispensable para la permeabilización ya que el tratamiento de las células con sialidasa disminuyó los niveles de coentrada de la toxina a niveles cercanos al control.

Este resultado sugiere que la internalización de la toxina es mediada por la interacción del virus con las moléculas celulares normalmente utilizadas durante una infección productiva.

Los siguientes puntos apoyan que la permeabilización a α -sarcina mediada por rotavirus correlaciona con la penetración del virus a la célula:

1. Los virus no activados con tripsina, que no son infecciosos pero que se adsorben a la célula huésped igual que los virus activados (Clark *et al.*, 1981, Fukuhara *et al.*, 1988, Kaljot *et al.*, 1988), no promovieron la coentrada de α -sarcina; por lo tanto se requiere más que la sola adsorción del rotavirus a la superficie celular para obtener la permeabilización.

2. Se ha sugerido que el corte proteolítico con tripsina induce cambios específicos en la estructura de VP4 necesarios para que el virus pueda interaccionar directamente con la membrana y ocurra la internalización. Los resultados de permeabilización obtenidos con la cepa SA114S mostraron una clara correlación entre penetración viral y coentrada. Los rotavirus SA114S activados con AspN ó α -quimotripsina (que no son infecciosos) (Arias *et al.*, 1996), no promovieron la coentrada de α -sarcina, y los niveles máximos de permeabilización se obtuvieron solamente con la activación subsecuente de éstos virus con tripsina. Por lo tanto, la precisión de los extremos generados por la digestión con tripsina es también importante para la permeabilización al igual que lo es en la infectividad.

3. Los rotavirus preincubados con los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra ambas proteínas de capa externa VP4 (MAb 2G4) y VP7 (MaAb 159), que bloquean la infección viral en un paso posterior a la unión (presumiblemente penetración) (Ruggeri & Greenberg, 1991), inhibieron la coentrada de α -sarcina. En este punto resulta interesante destacar el hecho de que el anticuerpo anti-VP7 inhiba la coentrada, sugiere que

ésta proteína puede tener un papel relevante en la permeabilización y por lo tanto en la penetración. No sabemos si el papel de VP7 es solamente estructural de tal manera que le dé a VP4 el soporte ó conformación necesaria para la coentrada, ó si participa directamente en los eventos de adsorción-penetración. Con anterioridad se planteó la participación de VP7 en alguna de las primeras interacciones del virus con la célula; incluso se ha visto que la especificidad de unión al receptor mediada por VP4, puede ser influenciada por el origen de la proteína VP7 acompañante (Méndez *et al.*, 1996); de igual manera, el análisis del producto de la coinfección con dos cepas diferentes evidenció que la proteína VP7 puede dar ventajas replicativas a la progenie viral, aumentando la eficiencia de la unión a la célula a través de VP4 (Xu & Woodc, 1994). Sin embargo, no podemos descartar que la inhibición de la penetración con éste anticuerpo, sea debido a un impedimento estérico, en el que el anticuerpo impida la interacción de VP4 con su (s) receptor (es) específico (s).

4. La coentrada de α -sarcina en aquellas líneas celulares menos susceptibles a la infección (L y Hep2), no se alcanzó ni con 1000 partículas infecciosas por célula; mientras que en la línea celular permisiva (MA104), 1 virus infeccioso por célula fué capaz de promover la cointernalización de α -sarcina que inhibió en un 50% la síntesis de proteínas. Sabemos que en éstas líneas celulares la penetración a través de la membrana es el paso limitante en la infección (Bass *et al.*, 1992); por lo tanto, *podemos concluir que la interacción rotavirus-célula huésped que conduce a ésta permeabilización es específica y depende de la permisividad de la línea celular a ser infectada.*

5. Los virus neutralizados con el MAb 159 (dirigido contra VP7) después de su adsorción inicial, no promovieron la coentrada de toxina (fig. 7 del artículo), *esto refleja que la permeabilización es simultánea ó muy cercana en tiempo a la entrada del virus.*

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo por el cual ocurre la penetración de rotavirus a la célula es controversial, estudios bioquímicos y ultraestructurales apoyan dos formas de entrada; penetración directa y endocitosis mediada por receptor (Bass *et al.*, 1995, Fukuhara *et al.*, 1987, Kaljot *et al.*, 1988, Ludert *et al.*, 1987, Quan & Doane, 1983, Suzuki *et al.*, 1985, Suzuki *et al.*, 1986).

Pese a que las evidencias de microscopía electrónica apoyan la hipótesis de endocitosis, los estudios funcionales con agentes lisosomotrópicos demuestran que el ingreso

del rotavirus al citosol no ocurre por mecanismos de fusión dependientes de pH como en otros virus no envueltos (rinovirus, poliovirus etc.) (Pérez & Carrasco, 1993).

Al evaluar el efecto de inhibidores de endocitosis como citocalasina D y dansilcadaverina sobre la coentrada de α -sarcina promovida por rotavirus, encontramos, como se puede observar en la Tabla 1 del artículo que, concentraciones en las que las drogas son funcionales (la infectividad de reovirus se disminuye más del 70%), la permeabilización a α -sarcina y la infectividad de rotavirus, no se vieron afectadas.

La dansilcadaverina inhibe la formación de vesículas de clatrina y citocalasina D despolimeriza actina (Bass *et al.*, 1995), por lo tanto podríamos decir que éstas funciones no son requeridas durante la penetración de rotavirus. Si sumamos éstas evidencias a los reportes en los que se demuestra que, el tratamiento de células poco permisivas a la infección por rotavirus con éstas mismas drogas incrementa hasta 10 veces su susceptibilidad a infectarse (Bass *et al.*, 1995), podemos considerar a la vía endocítica como una ruta "improductiva" encargada de secuestrar aquellas partículas no aptas para una replicación viral.

La bafilomicina A1 (BFLA1) es un inhibidor selectivo de la ATPasa de protones vacuolar (Bowman *et al.*, 1988) que ha sido ampliamente utilizado para disociar el papel del pH bajo y el del gradiente de protones durante la entrada de distintos virus (Carrasco, 1994, Carrasco, 1995). Para algunos sistemas virales (ej. Semliki) se demostró que la simple acidificación del medio no es suficiente para la entrada del genoma, sino que la energía acumulada en forma de gradiente de protones es lo que realmente promueve la translocación de la cápside viral al citoplasma (Irurzun *et al.*, 1997, Pérez & Carrasco, 1994). El papel de esta droga sobre la permeabilización a α -sarcina también ha sido evaluado, encontrándose en la mayoría de los casos, una correlación entre el efecto sobre penetración y coentrada. Adenovirus y poliovirus, parecen ser la excepción, ya que la infectividad no se ve afectada por BFLA1 pero sí la coentrada (Carrasco, 1995). En rotavirus, el tratamiento de las células con BFLA1 no afectó la infectividad ni la coentrada de α -sarcina.

Estos resultados implican que la entrada de rotavirus, al igual que la coentrada de α -sarcina, no requieren que la ATPasa de protones vacuolar sea funcional; por lo tanto ambos mecanismos son independientes de un pH ácido vacuolar y del gradiente de protones existente a través de la membrana endosomal. En conjunto estos resultados demuestran que

la internalización de α -sarcina solo se lleva a cabo si el virus entra a la célula por la vía productiva.

Aunque estas evidencias son un fuerte argumento en contra de la vía endocítica como el mecanismo de penetración en rotavirus, no existe una demostración directa que permita descartar que la internalización de rotavirus sea por un tipo muy particular de endocitosis.

En varias líneas celulares, se ha demostrado la existencia de rutas de endocitosis constitutiva, clatrina-independiente, que permiten el ingreso de ciertos ligandos; por ejemplo, la internalización de antígenos de histocompatibilidad en fibroblastos humanos se realiza por este mecanismo (Huet *et al.*, 1980). Otra posibilidad es que la invaginación de los endosomas sea independiente de los microfilamentos de actina (citocalasina D-resistente), como en la pinocitosis de solutos y partículas pequeñas (Mellman *et al.*, 1986).

El que no requieran de pH bajo para penetrar, pudiera reflejar que la penetración es independiente de pH como en otros virus. En poliovirus por ejemplo (Pérez & Carrasco, 1993), se sabe que pese a que su entrada es por endocitosis, la interacción del virus con su receptor induce cambios conformacionales en el virión de tal manera que se vuelve más hidrofóbico y estos cambios desestabilizan la membrana endosomal para liberar su genoma al citosol (Greber *et al.*, 1994).

En virtud de tantas evidencias indirectas en contra de la endocitosis, se ha propuesto la penetración directa a través de la membrana, como una hipótesis alternativa para explicar la penetración de rotavirus. Esta hipótesis se fundamenta principalmente en experimentos de permeabilización de vesículas de membranas y liposomas como consecuencia a la interacción con rotavirus (Nandi *et al.*, 1992, Ruiz *et al.*, 1994); éstos resultados hacen suponer que la interacción del virus con las membranas promovería la formación de poros por los cuales se liberaría el contenido intravesicular. Aunado a esto, se han realizado cinéticas de penetración en las que se encontraron dos tiempos promedios de internalización uno rápido (3-5 min.) y otro lento (30-50 min.), atribuibles a penetración directa y endocitosis respectivamente (Kaljot *et al.*, 1988).

Hasta ahora no podemos establecer inequívocamente si la entrada del virus es a través de endocitosis, ó de penetración directa. De hecho, se ha sugerido que durante una infección por rotavirus ambos mecanismos se llevan a cabo. Cuál de las vías de entrada es utilizada por el rotavirus, va a depender de la activación proteolítica con tripsina; se ha propuesto que los

viriones intactos, entran a la célula lentamente por endocitosis y no producen progenie viral; mientras que la entrada de virus activados con tripsina es rápida y conduce a una infección productiva (Kaljot *et al.*, 1988).

Existen otros sistemas virales en los que se ha reportado más de un mecanismo de penetración. Los estudios de la infección del virus de la hepatitis murina (MHV), sugieren que aunque una pequeña fracción del inóculo viral se internaliza por endocitosis, la infección productiva se genera por partículas que entran predominantemente por fusión no ácida, a nivel de membrana plasmática (Kooi *et al.*, 1991).

El estudio del mecanismo de penetración de los rotavirus ha sido obstaculizado por la falta de metodología que específicamente detecte la entrada de las partículas infecciosas. Las estrategias experimentales tradicionalmente utilizadas para éste fin han sido la microscopía electrónica, y los ensayos de protección de virus marcados radioactivamente a la digestión de proteasas externas. La limitante de éstos métodos es que detectan la entrada global, es decir, la de virus infecciosos y la de partículas no infecciosas; vale la pena recordar que éste es un factor relevante en rotavirus ya que la relación de partículas físicas/partículas infecciosas en algunas cepas de rotavirus es alrededor de 100:1.

Se han desarrollado otros ensayos para estudiar la entrada de rotavirus como: la permeabilización de liposomas y vesículas medida por la liberación de indicadores fluorescentes (carboxifluoresceína) (Nandi *et al.*, 1992, Ruiz *et al.*, 1994); y la formación de sincicios (células multinucleadas) que refleja la capacidad del virus de inducir fusión desde afuera (Falconer *et al.*, 1995). Estos métodos, aunque apoyan la teoría de penetración directa, presentan ciertas diferencias entre los requerimientos para su desarrollo y los necesarios para una infección.

Si hacemos una comparación entre ambos métodos y el sistema de coentrada descrito en este trabajo, encontramos que:

A diferencia del sistema de coentrada en el que únicamente las células susceptibles a la infección son permeabilizadas a α -sarcina; liposomas de distintas composiciones (Nandi *et al.*, 1992) y membranas de distintos orígenes (Ruiz *et al.*, 1994) liberan su contenido en presencia de virus. Esta permeabilización de vesículas podría ser considerada un tanto inespecífica ya que presupone que los rotavirus pueden omitir la interacción virus-receptor y que la penetración únicamente requiere de la interacción del virus con los lípidos de membrana.

Además la liberación de carboxifluoresceína de las vesículas es inhibida con 1mM calcio y la inhibición se revierte añadiendo quelantes de calcio (Ruiz *et al.*, 1994).

Por otra parte, la fusión desde afuera tampoco se ve afectada por el tratamiento del virus con quelantes de calcio (Falconer *et al.*, 1995). En ambos casos esta condición es totalmente contraria a la requerida durante la infección, ya que el medio de cultivo que se utiliza para la infección tiene niveles de calcio en rango mM, y se sabe que en ausencia de Ca^{2+} no ocurre la infección. En contraste, la permeabilización a toxinas se realiza en concentraciones fisiológicas de calcio (1.8 mM), y el tratamiento con EDTA la bloquea, reflejando lo que ocurre con la infección viral.

En ambos casos (fusión desde afuera y la permeabilización de vesículas a carboxifluoresceína), los máximos niveles de fusión y permeabilización se alcanzan con 100 ó más partículas infecciosas por célula; una partícula infecciosa no es capaz de producir evidencia alguna de penetración por estos sistemas. Contrario a esto, en el sistema de coentrada de α -sarcina 1 partícula infecciosa/célula fué capaz de inducir la permeabilización del 50% de las células y el máximo de permeabilización se alcanzó con 10 partículas infecciosas por célula (ver figs. 2 y 5 del artículo).

En conclusión la caracterización de la permeabilización temprana a toxinas descrita en este trabajo, nos permite sugerir que, metodológicamente, este sistema refleja mejor las condiciones reales de la infección y por lo tanto representa una buena herramienta para el estudio de la penetración de rotavirus.

El siguiente evento durante el inicio de la infección por rotavirus es la desencapsidación ó desnudamiento de la partícula viral, que como se mencionó anteriormente, consiste en la pérdida de las proteínas de la capa externa VP4 y VP7, con la subsecuente activación de la transcriptasa viral. *In vivo* no es claro si el desnudamiento viral ocurre durante la penetración ó una vez que el virus llega al citosol.

In vitro, la solubilización de la capa externa se obtiene por el tratamiento con agentes quelantes de calcio (Cohen *et al.*, 1979). La estabilidad de muestras de rotavirus humano almacenadas *in vitro* depende de que el medio de almacenamiento contenga concentraciones de por lo menos 100 nM de calcio (Shirley *et al.*, 1981).

Tomando en cuenta estos resultados se ha especulado que el desnudamiento viral podría darse como consecuencia de la baja concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$); es decir, que las partículas virales completas penetran al citoplasma y que el desnudamiento ocurre en el interior del citosol al encontrar un bajo ambiente de calcio.

De manera opuesta existe otra hipótesis que sugiere que durante la interacción del virus con su receptor, las proteínas de la capa externa sufren cambios conformacionales, el virus se desnuda y solo partículas de doble capa penetran al citoplasma.

En algunos sistemas virales existen evidencias que demuestran que la unión al receptor puede ocasionar cambios en la partícula viral que resultan ó contribuyen con la penetración y desnudamiento. La unión de los picornavirus (poliovirus y rinovirus) a su receptor, induce cambios en la estructura de la cápside viral que son esenciales para la infección. La hipótesis del cañón propuesta para explicar la interacción virus-receptor de éstos virus sugiere que un dominio del receptor interacciona con una depresión en la superficie viral e induce la exposición del extremo amino terminal de la proteína VP1 y la disociación de la proteína VP4. La partícula viral modificada probablemente se embebe en la membrana, la desestabiliza y promueve la liberación del RNA hacia el citosol (Greber *et al.*, 1994).

En rotavirus la evidencia que permite sugerir un mecanismo similar para su desnudamiento es la observación de que las proteínas VP4 y VP7 permanecen adheridas en la superficie celular y solo partículas de doble capa son internalizadas (Fukuhara *et al.*, 1988).

En éste trabajo nos propusimos determinar si el incremento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) tenía algún efecto sobre la coentrada de α -sarcina y sobre los primeros eventos de la infección por rotavirus. En éstos experimentos utilizamos dos enfoques distintos para lograr un incremento de calcio intracelular: el uso de ionóforos de calcio (ionomicina y A23187) y un inhibidor de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (tapsigargina).

La ionomicina y A23187 son ionóforos carboxílicos que tienen la habilidad de formar complejos con cationes e intercambiarlos por protones a través de membranas de células y organelos (Liu & Hermann, 1978). Ambos ionóforos unen cationes divalentes pero no monovalentes, experimentos de competencia de iones demuestran una selectividad por $Ca^{2+} > Mg^{2+} \gg Sr^{2+} \sim Ba^{2+}$ (Liu & Hermann, 1978). En presencia de calcio extracelular, el

incremento en la $[Ca^{2+}]_i$; ocasionado por la presencia de éstos ionóforos, se debe principalmente a una entrada de calcio del medio externo.

Tapsigargina es un inhibidor específico de las ATPasas de calcio intracelular tanto de las SERCA ATPasas (ATPasas residentes de la membrana del retículo sarcoplásmico de células musculares), como de las ATPasas del retículo endoplásmico de células no musculares (Inesi & Sagara, 1992, Thastrup, 1990). Estas enzimas bombean el calcio citoplásmico hacia el retículo endoplásmico como uno de los mecanismos que tiene la células para mantener la homeostásis de calcio. La tapsigargina produce un efecto global en la enzima, manifestado principalmente por la inhibición de su alta afinidad por calcio y también por interferir con otras reacciones independientes de calcio (ej. unión de ATP, unión de fósforo inorgánico etc.) (Inesi & Sagara, 1992). Por lo tanto la tapsigargina ocasiona que los reservorios intracelulares se vacíen como consecuencia de la inhibición de una de las rutas de entrada, ocasionando con ésto una elevación en la $[Ca^{2+}]_i$.

La preincubación de las células MA104 con ionóforos de calcio y tapsigargina no afectó la coentrada de α -sarcina mediada por el rotavirus RRV.

Como se puede ver en la fig. 8 incluida en el artículo, los ionóforos y la tapsigargina no inhibieron la reducción en la síntesis de proteínas ocasionada por la entrada de α -sarcina en presencia de RRV (barras negras). El A23187 por sí solo redujo 50% la síntesis de proteínas en las células MA104. Por alguna razón, A23187 resultó ser más "agresivo" para las células que la ionomicina. Sin embargo, el efecto inhibitorio que refleja la entrada de α -sarcina alcanzó niveles similares que en ausencia del ionóforo. Estos resultados demuestran que el incremento intracelular de calcio ocasionado por estas drogas no afecta la permeabilización a α -sarcina ni la penetración de rotavirus.

En vista de que la penetración de rotavirus no se afectó por el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, y tomando en cuenta el trabajo de Ludert quien reportó que la adición de A23187 minutos después de la penetración, inhibe la desencapsidación del rotavirus porcino OSU, decidimos estudiar el papel del calcio intracelular sobre el desnudamiento de rotavirus.

La estrategia que utilizamos fué medir la síntesis de proteínas virales como reflejo del desnudamiento del virus en presencia de los ionóforos y tapsigargina. La detección de proteínas virales indica de manera indirecta que ocurrió la transcripción del genoma y por lo tanto la previa desencapsidación. La síntesis de proteínas medida 4 horas post-infección

reveló que el incremento en calcio intracelular ocasionado por éstas drogas no inhibe el desnudamiento viral, en condiciones en las que la $[Ca^{2+}]_i$ se incrementó 3.8 veces con respecto al nivel basal (para el caso de ionomicina).

No existe una explicación satisfactoria para entender las discrepancias encontradas entre nuestros resultados y los reportados por Ludert y colaboradores (Ludert *et al.*, 1987). Sus conclusiones se basan en la caracterización de las diferencias de densidad entre partículas de doble (DLP) y triple capa (TLP) purificadas por gradientes de CsCl. En éste estudio se encontró que dos horas post-infección en ausencia del ionóforo, los virus migran como DLP's, mientras que en presencia del ionóforo A23187 las partículas tienen la densidad de viriones completos. Al utilizar gradientes de CsCl como herramienta para analizar el tipo de partículas que se obtuvieron, se evaluó principalmente la porción de partículas físicas presentes en la muestra y no la de virus infeccioso. En éstas condiciones existe la posibilidad de que las partículas físicas, deficientes en replicación pero aptas para la unión, puedan ingresar por la vía no productiva (posiblemente endocitosis) de tal manera que no se desencapsidan y son detectadas como TLP's. La otra posible explicación es que por este método se detectan las partículas que aún permanecen adsorbidas a la superficie celular y que no fueron internalizadas, ya que no hubo un tratamiento con proteasas que asegure el análisis de los viriones internalizados por la eliminación de los virus que permanecieron unidos a la superficie de la célula.

Al evaluar síntesis de proteína viral, nuestros resultados detectan partículas infecciosas que constituyen una mínima proporción del inóculo total y que son biológicamente relevantes ya que fueron capaces de penetrar, desencapsidarse e iniciar la transcripción y traducción.

Los tiempos de adición del ionóforo son otro punto importante a considerar en la interpretación de sus resultados ya que, mediante ensayos de dispersión de luz, se ha reportado que *in vitro* la transición de TLP a DLP en 300 nM Ca^{2+} (a 37 °C), ocurre en tiempos menores a 30 segundos (Ruiz *et al.*, 1996). Por lo tanto el añadir el ionóforo 15 minutos después de la penetración (condiciones experimentales de Ludert y cols.) puede ser un tiempo en el cual ya la mayor parte de las partículas debieron haberse desnudado. En nuestros experimentos, el ionóforo se agregó minutos antes que el inóculo viral de tal manera que la penetración y desnudamiento se dió en condiciones en las que el calcio se elevó previamente.

Nuestros resultados sugieren que el desnudamiento de los rotavirus no es disparado por concentraciones bajas de calcio intracelular.

Estos datos concuerdan con las observaciones de Ruiz y colaboradores (Ruiz *et al.*, 1996), quienes reportaron que la concentración de calcio a la cual se da la transición de virus completo a DLP *in vitro*, es dependiente de la cepa y que para la cepa RRV ésta concentración oscila alrededor de 38 nM; concentración muy por debajo del nivel basal de Ca^{2+} de las células MA104 que oscila entre los 100 y 200 nM.

Sería de esperarse que la señal disparadora del desnudamiento fuese la misma para todas las cepas de rotavirus. Los resultados obtenidos por Ruiz y colaboradores (Ruiz *et al.*, 1996) en los que encontraron que la concentración mínima de calcio responsable de la pérdida de la capa externa varía de acuerdo a la cepa, no concuerdan con la capacidad de los virus estudiados para infectar eficientemente la misma línea celular.

Se ha visto que los flujos de ciertos iones como K^+ , Na^+ , y Ca^{++} se ven incrementados minutos después de la interacción de ciertos virus con su célula huésped (ej. Sendai) (Carrasco *et al.*, 1989). En rotavirus no se ha explorado si existe algún cambio de permeabilidad en la membrana a estos iones durante las interacciones iniciales del virus con la superficie celular. Dado que los resultados reportados en éste trabajo sugieren que la penetración de los rotavirus pudiera ser a través de poros y que éstos se utilizan para la coentrada de otras macromoléculas, podríamos especular que sería muy probable que ésta misma permeabilización permitiera el flujo de calcio en favor del gradiente, de tal forma que las concentraciones de calcio se vieran incrementadas temporalmente durante la penetración. De ser así, el calcio intracelular se vería aumentado de manera natural en el inicio de la infección y esto no afectaría el desnudamiento.

El hecho de que el bajo calcio intracelular parezca no ser el efector del desnudamiento apoya la hipótesis de desencapsidación a nivel de membrana.

Esta hipótesis como se describió anteriormente, propone que al interactuar con su receptor, el rotavirus sufre cambios conformacionales y pierde la capa externa.

Aunque no se sabe si ocurren cambios conformacionales durante la unión de los rotavirus con su receptor; existen reportes previos en los que se ha observado que la interacción del rotavirus SA11 con otro tipo de ligandos (anticuerpos monoclonales anti VP4,

10G6 y 7G6), ocasiona cambios conformacionales en ésta proteína que desestabilizan las interacciones VP4 - VP7, éstos cambios promueven alteraciones globales en la estructura del virión que conducen a la pérdida de la capa externa y a la disminución de la infectividad (Zhou *et al.*, 1994).

No sería sorprendente encontrar que la asociación del rotavirus con alguno de los receptores en la superficie celular condujera a cambios conformacionales en la partícula viral que le permitiese desnudarse, ó que expusieran regiones nuevas necesarias para la desencapsidación. Es claro que se requiere de nuevos estudios para explorar los eventos que ocurren en la partícula viral cuando ésta se une a su célula huésped, y determinar si existe algún cambio conformacional en el virus asociado a los procesos de adsorción ó penetración y así poder establecer relaciones entre estos eventos y la desencapsidación

Pese que nuestros resultados contradicen la hipótesis del desnudamiento de rotavirus debido al bajo calcio citoplásmico, no podemos descartar la posibilidad de que la desencapsidación se realice en el citoplasma y que sea algún otro factor celular diferente al calcio, el responsable directo de éste evento. Para la mayoría de los virus, la desencapsidación ocurre en el citoplasma, no sólo los que allí se replican, sino también en aquellos cuya replicación se lleva a cabo en el núcleo.

El ejemplo mejor caracterizado de desencapsidación citoplásmica es el de los alfavirus (Greber *et al.*, 1994, Singh & Helenius, 1992). Estos virus dependen del cambio de pH endosomal para fusionarse con la membrana y liberar su cápside al citosol. Una vez en el citoplasma, las nucleocápsides son removidas rápidamente por la subunidad ribosomal 60S; la transferencia de las proteínas de la cápside a los ribosomas es necesaria y suficiente para liberar el RNA. El RNA permanece unido a la cara citoplásmica de la membrana endosomal donde ocurre la traducción, transcripción y replicación del genoma (Singh & Helenius, 1992). Para rotavirus no tenemos ninguna evidencia que sugiera la participación de algún factor celular en desnudamiento, sin embargo, es una posibilidad que no debe descartarse y amerita ser explorada.

Dado que uno de nuestros intereses consiste en determinar cuáles son las regiones de la proteína VP4 que participan directamente en el evento de penetración del virus, y dado que hasta ahora no ha sido posible establecer un sistema de genética reversa en rotavirus que nos permita modificaciones por mutagénesis dirigida, decidimos explorar si las pseudo-partículas

virales (VLP's), obtenidas en células de insecto, tenían la capacidad de penetrar a la célula de modo similar a un virus nativo. Para ésto, en éste trabajo implementamos la producción de VLP's mediante la utilización del sistema de expresión de baculovirus. En las VLP's se ensamblaron cada una de las proteínas estructurales de rotavirus cuyos genes fueron co-expresados en las células de insecto, de manera similar a los resultados previamente reportados (Crawford *et al.*, 1994).

Usando el ensayo de coentrada descrito previamente, determinamos si las VLP's podían inducir cointernalización de α -sarcina. Encontramos que las VLP's de composición 2/6/7/4 no sólo se asemejan a viriones completos, sino que también son funcionalmente similares a los virus maduros, ya que promovieron la permeabilización a α -sarcina tan eficientemente como el rotavirus RRV.

Estos resultados nos demuestran que la replicación viral al igual que la síntesis de proteínas virales "de novo" no se requieren para promover la coentrada, y que las proteínas estructurales VP2, VP6, VP7 y VP4 en el contexto de la partícula viral tienen la información necesaria que conduce a ésta permeabilización. Estos resultados concuerdan con las observaciones hechas por Carrasco y colaboradores, quienes demostraron que no se requiere la expresión génica viral ni celular para obtener éste cambio en la permeabilidad de la membrana (Carrasco, 1995).

Con la finalidad de caracterizar la coentrada promovida por VLP's, evaluamos el papel de VP4 en este ensayo de penetración. Solo las VLP's conteniendo la proteína VP4 incorporada en su estructura fueron capaces de permeabilizar las células a α -sarcina. La incapacidad de las VLP's 2/6 y 2/6/7 para promover la coentrada, refleja la incapacidad de unión de éstas partículas a la superficie celular. El papel de la VP4 en la adsorción de las VLP's ya ha sido establecido y, se ha demostrado que las VLP's que carecen de VP4 no se unen a células MA104 en suspensión (Crawford *et al.*, 1994).

Al evaluar el papel de los residuos de ácido siálico en la unión de las VLP's a la célula encontramos que el tratamiento con neuraminidasa (NA) no inhibió la coentrada de la toxina. La adsorción mediada por residuos de ácido siálico es el paso inicial para que las cepas de origen animal puedan penetrar e iniciar la infección (Fukudome *et al.*, 1989, Keljo & Smith, 1988); sin embargo, ya se demostró que los rotavirus mutantes de cepas que infectan animales (rotavirus nar y gpr) pueden obviar ésta interacción e infectar eficientemente su célula blanco

(Méndez *et al.*, 1993), en éstos estudios se comprobó que la unión a ácido siálico no representa un paso esencial en la infección de células epiteliales en cultivo, además de evidenciar la existencia de una segunda interacción rotavirus-célula huésped independiente de ácido siálico que conduce probablemente a la penetración del virus a la célula. Mediante el uso de éstas mutantes se sabe que la proteína VP4 puede modificar su estructura y evadir ésta primera interacción, de tal manera que otro dominio diferente al de unión con ácido siálico dentro de VP8 ó quizás en VP5, sea el responsable de permitir una adsorción independiente del siálico.

Una posible explicación a la permeabilización obtenida con VLP's completas en células tratadas con neuraminidasa y que concuerda con la posibilidad de cambios conformacionales en VP4, es que éstas partículas se adsorban más eficientemente a células que carecen de ácido siálico al igual que los rotavirus humanos y las mutantes nar y gpr. Estudios preliminares en nuestro laboratorio han establecido que la infectividad de las cepas humanas y de las mutantes se incrementa hasta más de dos veces por el tratamiento de las células con neuraminidasa (Méndez, E., comunicación personal). Es posible que exista algún cambio conformacional en la proteína VP4 de las VLP's que les permite adsorberse a la célula en ausencia de ácido siálico e interaccionar más eficientemente con la molécula responsable de la penetración.

Pese a que la presencia de VP4 en las VLP's es indispensable para la coentrada de α -sarcina, observamos que ésta cointernalización no depende del corte proteolítico de VP4 con tripsina. Previamente se ha reportado el uso de VLP's en ensayos de penetración, VLP's cuyas proteínas estructurales provienen de la cepa de simio RRV promovieron fusión desde afuera de manera dependiente de tripsina (Gilbert & Greenberg, 1997). De igual manera, Liprandi y colaboradores reportaron recientemente un ensayo de coentrada a α -sarcina con VLP's con VP4 y VP6 de SA11 en un fondo genético de VP2 y VP7 de RF donde la activación con tripsina es un requisito indispensable para obtener cointernalización (Liprandi *et al.*, 1997). Las posibles razones para explicar la independencia del corte con tripsina obtenida en este trabajo son:

1) La existencia de algún contaminante en la preparación, que inespecíficamente permeabilice la membrana. Esta posibilidad parece poco probable dado que preparaciones de lotes de VLP's producidos independientemente se comportaron de la misma manera, además de que

en las preparaciones de VLP's 2/6 y 2/6/7 no está presente el supuesto contaminante. 2) La cantidad de VP4 previamente cortada en las preparaciones sea suficiente para inducir coentrada, y/ó 3) La existencia de un cambio conformacional en VP4 ó VP7 de SA11 durante el ensamble en éstas VLP's. Esta última parece explicar los resultados referentes al requerimiento del corte con tripsina para promover la permeabilización y la falta de neutralización obtenida con la preincubación de las partículas con anticuerpos.

Actualmente, se desconoce el mecanismo molecular por el cual se ensamblan las proteínas virales en las células de insecto para dar lugar a las VLP's. Se ha propuesto que el ensamble puede ocurrir en el citoplasma y que las partículas son liberadas al medio externo al momento de la lisis celular, ó bien que las proteínas se excretan al medio extracelular donde ocurre el ensamble (Crawford *et al.*, 1994). Independientemente del mecanismo de formación de las VLP's, sabemos que éste es un sistema artificial y no la vía natural de ensamble de los rotavirus. La morfogénesis de los rotavirus es un proceso altamente coordinado en el que participan tanto proteínas y ácidos nucleicos virales como celulares. Por lo tanto, no es de extrañarse que pese a que las VLP's se asemejan morfológicamente a los viriones maduros y su caracterización por microscopía electrónica y Western blot no reflejó cambios significativos en las proteínas estructurales, éstos análisis pueden resultar muy burdos para detectar cambios conformacionales finos que suponemos son los responsables de la falta de neutralización con los anticuerpos y de la penetración independiente de tripsina observados en este trabajo.

También utilizamos VLP's de la cepa porcina YM ensambladas en nuestro laboratorio para realizar ensayos de coentrada. Los resultados indican que las VLP's 2/6/7/4 de YM, promueven la cointernalización de α -sarcina de una manera dosis y tripsina dependiente. Estos resultados apoyan nuevamente la hipótesis de que existen cambios conformacionales en las VLP's de SA11.

El estudio directo del papel de cada una de las proteínas de capa externa en la penetración de los rotavirus ha sido obstaculizado por la falta de un sistema que permita mutagenizar específicamente las regiones que pueden participan en éste proceso.

Creemos que si las VLP's son capaces de mimetizar las primeras interacciones rotavirus-célula huésped, éstas pueden representar una valiosa herramienta que, en

combinación con el ensayo de coentrada a α -sarcina, podrían establecer un modelo experimental que permita conocer con detalle el proceso de penetración de los rotavirus.

PERSPECTIVAS

En nuestro grupo de trabajo, actualmente se están desarrollando diversos proyectos de investigación encaminados a entender mejor las primeras interacciones rotavirus-célula huésped que conducen a la infección productiva. Algunas de las preguntas que nos gustaría resolver son: ¿Cuántas moléculas receptoras están involucradas en la penetración de los rotavirus?, ¿Cuáles son éstas moléculas y cuál es su naturaleza bioquímica?, ¿Qué regiones de las proteínas de capa externa de los rotavirus son las responsables de interaccionar con éstas moléculas?, ¿En cuál de los eventos iniciales de la infección participan las integrinas reconocidas por VP4 y VP7?

En cuanto al sistema de VLP's, creemos que si logramos obtener partículas capaces de mimetizar finamente las interacciones virus-célula huésped que conducen a la infección, la mutagénesis de regiones importantes para penetración utilizando VLP's, en conjunto con el sistema de coentrada de α -sarcina representan un buen modelo experimental para disectar el proceso de penetración. El cambio conformacional en las proteínas de SA11 al ser ensambladas en VLP's, que sugerimos como responsable del no requerimiento del corte con tripsina de éstas partículas para promover coentrada ¿es funcionalmente relevante? De ser así, éstas VLP's también podrían ayudarnos a identificar algunas de las moléculas involucradas en la internalización de rotavirus.

La utilización del sistema de coentrada de toxinas descrito en éste trabajo, en conjunto con diversas estrategias experimentales representa una buena herramienta para abordar éstas preguntas de investigación. Así mismo, éste sistema nos ha ayudado a entender algunos aspectos relacionados con la penetración de los rotavirus.

De igual manera, los datos obtenidos sobre desencapsidación, que sugieren que la baja concentración de calcio intracelular no es el disparador del desnudamiento, abren un panorama de preguntas interesantes que de obtener respuestas, contribuirán a conocer más acerca de los primeros eventos de la infección de los rotavirus.

1. ¿Cuál de los primeros pasos de la interacción virus-célula huésped es el que conduce a los cambios en la permeabilidad de la membrana?

2. ¿Cuál es el mecanismo de la coentrada? es decir, ¿se requiere de una interacción toxina-membrana de tal manera que el virus promueve su translocación al citoplasma, ó el virus es capaz de inducir la internalización de moléculas presentes en solución en el medio extracelular?

3. En vista de que los rotavirus no necesitan de la energía proporcionada por el gradiente de protones vacuolar para penetrar. ¿Se requiere de algún otro proceso energético en la internalización de estos virus hacia el citosol?

4. Si la desencapsidación de los rotavirus ocurre independientemente de los niveles de Ca^{2+} intracelular, ¿Existe algún otro factor intracelular responsable del desnudamiento, o éste se da en la membrana plasmática durante la penetración?

REFERENCIAS

- Almela, M. J., González, M. E. & Carrasco, L. (1991). Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. *J. Virol.* **65**, 2572-2577.
- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V. & López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* **70**, 5832-5839.
- Bass, D. M., Baylor, M., Chen, C. & Upadhyayula, U. (1995). Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology*. **212**, 429-437.
- Bass, D. M., Baylor, M. R., Chen, C., Mackow, E. M., Bremont, M. & Greenberg, H. B. (1992). Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* **90**, 2313-2320.
- Bass, D. M., Mackow, E. R. & Greenberg, H. B. (1991). Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology* **183**, 602-610.
- Bowman, E. J., Siebers, A. & Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7972-7976.
- Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L. & Sperti, S. (1989). Effect of α -Sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* **257**, 723-727.
- Carrasco, L. (1994). Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS letters* **350**, 151-154.
- Carrasco, L. (1995). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv. Virus Res.* **45**, 61-112.
- Carrasco, L., Otero, M. J. & Castrillo, J. L. (1989). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Pharmac. Ther.* **40**, 171-212.
- Charpilienne, A., Abad, M. J., Michelangeli, F., Alvarado, F., Vasseur, M., Cohen, J. & Ruiz, M. C. (1997). Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J. Gen. Virol.* **78**, 1367-1371.
- Chen, D., Burns, J. W., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1989). Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3743-3747.
- Chen, D. Y., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1992). Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope. *J. Virol.* **66**, 432-439.
- Clark, S. M., Roth, J. R., Clark, M. L., Barnett, B. B. & Spendlove, R. S. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* **39**, 816-822.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* **60**, 177-186.
- Coulson, B. S., Londrigan, S. H. & Lee, D. J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5389-5394.
- Crawford, S., Labbé, M., Cohen, J., Burroughs, M. H., Zhou, Y.-J. & Estes, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* **68**, 5945-5952.
- Drose, S., Bindseil, K. U., Bowman, E. J., Siebers, A., Zeeck, A. & Altendorf, K. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochem.* **32**, 3902-3906.
- Endo, Y. & Wool, I. G. (1982). The site of action of α -Sarcin on eukariotic ribosome. *J. Biol. Chem.* **257**, 9054-9060.
- Espejo, R. T., Lopez, S. & Arias, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**, 156-60.
- Estes, M. K. (1996). Rotaviruses and their replication. *Fields, Virology* **2**, 1625-1655.
- Estes, M. K. & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**, 410-449.

- Estes, M. K., Graham, D. Y. & Mason, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* **39**, 879-888.
- Falconer, M. M., Gilbert, J. M., Roper, A. M., Greenberg, H. B. & Gavora, J. S. (1995). Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. *J. Virol.* **69**, 5582-5591.
- Fernández-Puentes, C. & Carrasco, L. (1980). Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell.* **20**, 769-775.
- Fuentes Panana, E. M., Lopez, S., Gorziglia, M. & Arias, C. F. (1995). Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J. Virol.* **69**, 2629-2632.
- Fukudome, K., Yoshie, O. & Konno, T. (1989). Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology.* **172**, 196-205.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. & Konno, T. (1988). Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* **62**, 2209-2218.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S., Konno, T. & Ishida, N. (1987). Evidence for endocytosis-independent infection by human rotavirus. *Arch. Virol.* **97**, 93-99.
- García, M. C., Guinea, R., Benavente, J. & Carrasco, L. (1996). The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. *J. Virol.* **70**, 576-579.
- Gasset, M., Mancheño, J. M., Lacadena, J. A., M. d. P., Oñaderra, M. & Gavilanes, J. G. (1995). Spectroscopic characterization of the alkylated α -sarcin cytotoxin: analysis of the structural requirements for the protein-lipid bilayer hydrophobic interaction. *Biochem. et Biophys. Acta* **1252**, 43-52.
- Gilbert, J. & Greenberg, H. B. (1997). Virus-like particle-induced fusion from without in tissue culture cells: role of outer-layer proteins VP4 and VP7. *J. Virol.* **71**, 4555-4563.
- Glass, R. I., Gentsch, J. R. & Ivanoff, B. (1996). New lessons for rotavirus vaccines. *Science* **272**, 46-48.
- Greber, U. F., Singh, I. & Helenius, A. (1994). Mechanisms of virus uncoating. *Trends in microbiology* **2**, 52-56.
- Guinea, R. & Carrasco, L. (1995). Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of Influenza virus into cells. *J. Virol.* **69**, 2306-2312.
- Haywood, A. M. (1994). Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J. Virol.* **68**, 1-5.
- Huet, C., Ash, J. F. & Singer, S. J. (1980). The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts. *Cell* **21**, 429-438.
- Inesi, G. & Sagara, Y. (1992). Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular Ca^{2+} transport ATPases. *Arch. of Biochem. Biophys.* **298**, 313-317.
- Irurzun, A., Nieva, J.-L. & Carrasco, L. (1997). Entry of Semliki Forest virus into cells: Effects of concanamycin A and nigericin on viral membrane fusion and infection. *Virology.* **227**, 488-492.
- Isa, P., López, S., Segovia, L. & Arias, C. F. (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J. Virol.* **71**, 6749-6756.
- Joklik, W. K. (1983). The Reoviridae. *Plenum Press, New York.* 107-195.
- Kaljit, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. & Greenberg, H. B. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**, 1136-1144.
- Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1996). Rotaviruses. *Fields, Virology* **2**, 1657-1708.
- Keljo, D. J. & Smith, A. K. (1988). Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **7**, 249-256.

- Kooi, C., Cervin, M. & Anderson, R. (1991). Differentiation of acid-pH-dependent and-nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* **180**, 108-119.
- Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5233-5250.
- Liprandi, F., Moros, Z., Gerder, M., Ludert, J. E., Pujol, F. H., Ruiz, M. C., Michelangeli, F., Charpilienne, A. & Cohen, J. (1997). Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor α -sarcin. *Virology* **237**, 430-438.
- Liu, C.-m. & Hermann, T. E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* **253**, 5892-5894.
- López, S., Arias, C. F., Bell, J. R., Strauss, J. H. & Espejo, R. T. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* **144**, 11-19.
- Ludert, J. E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F. & Esparza, J. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* **27**, 95-101.
- Mackow, E. R., Shaw, R. D., Matsui, S. M., Vo, P. T., Dang, M. N. & Greenberg, H. B. (1988). The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 645-649.
- marsh, M. & Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Advances in virus research*. **36**, 107-151.
- Marsh, M. & Pelchen-Matthews, A. (1994). The endocytic pathway and virus entry. *Cellular receptors for animal viruses*. 215-240.
- Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 663-700.
- Méndez, E., Arias, C. F. & Lopez, S. (1993). Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**, 5253-5259.
- Méndez, E., Arias, C. F. & Lopez, S. (1996). Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* **70**, 1218-1222.
- Nandi, P., Charpilienne, A. & Cohen, J. (1992). Interaction of rotavirus particles with liposomes. *J. Virol.* **66**, 3363-3367.
- Otero, M. J. & Carrasco, L. (1987). Proteins are cointernalized with virion particles during early infection. *Virology* **160**, 75-80.
- Patton, J. T. (1995). Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* **76**, 2633-2644.
- Patton, J. T., Hua, J. & Mansell, E. A. (1993). Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VPS* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J. Virol.* **67**, 4848-4855.
- Pérez, L. & Carrasco, L. (1993). Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J. Virol.* **67**, 4543-4548.
- Pérez, L. & Carrasco, L. (1994). Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* **75**, 2595-2606.
- Quan, C. M. & Doane, F. W. (1983). Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology* **20**, 223-231.
- Raming, R. F., Shaw, A., Chen, D., Estes, M. K., Chiu, W. & Prasad, B. V. V. (1993). Rotavirus protein interactions, phenotypes, and virion structure, abstr. W21-3. In *IXth International congress of virology*, 43.
- Ruggeri, F. M. & Greenberg, H. B. (1991). Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* **65**, 2211-2219.

- Ruiz, M. C., Alonso, T. S., Charpilienne, A., Vasseur, M., Michelangeli, F., Cohen, J. & Alvarado, F. (1994). Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J Virol* **68**, 4009-4016.
- Ruiz, M. C., Charpilienne, A., Liprandi, F., Gajardo, R. M., F. & Cohen, J. (1996). The concentration of Ca^{2+} that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J. Virol.* **70**, 4877-4883.
- Shirley, J. A., Beards, G. M., Thouless, M. E. & Flewett, T. H. (1981). The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus. *Arch. Virol.* **67**, 1-9.
- Singh, I. & Helenius, A. (1992). Role of ribosomes in Semliki Forest Virus nucleocapsid uncoating. *J. Virol.* **66**, 7049-7058.
- Spencer, E. & Arias, M. L. (1981). In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J Virol* **40**, 1-10.
- Summers, M. D. & Smith, G. E. (1987). A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas agricultural experiment station. Bulletin No. 1555*.
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Konno, T., Sato, T. & Ishida, N. (1985). Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch Virol* **85**, 25-34.
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Sato, T., Konno, T., Iwasaki, Y., Numazaki, Y. & Ishida, N. (1986). Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Arch. Virol.* **91**, 135-144.
- Thastrup, O. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2466-2470.
- Tosteson, M. T., Nibert, M. L. & Fields, B. N. (1993). Ion channels induced in lipid bilayers by subviral particles of the nonenveloped mammalian reoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10549-10552.
- White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science.* **258**, 917-924.
- Xu, Z. & Woode, G. N. (1994). Studies on the influence of the VP7 gene on rotavirus replication. *Viol.* **198**, 394-398.
- Yolken, R. H., Willoughby, R., Wee, S. B., Miskuff, R. & Vonderfecht, S. (1987). Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J. Clin Invest* **79**, 148-154.
- Zhou, Y. J., Burns, J. B., Morita, Y., Tanaka, I. & Estes, M. K. (1994). Localization of rotavirus VP4 neutralization epitopes involved in antibody-induced conformational changes of virus structure. *J. Virol.* **68**, 3955-3964.