



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

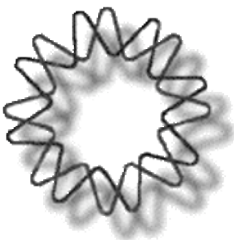
**CARACTERIZACION DEL PAPEL DE CHAPERONA
DE LA PROTEINA HSC70 EN LA INFECCION POR
ROTAVIRUS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA :

M. EN C. JIMENA PEREZ-VARGAS OBREGON



CUERNAVACA, MORELOS

2006



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.

INDICE

1. Abreviaciones	2
2. Resumen	4
3. Summary	5
4. Introducción	6
5. Objetivos	15
6. Materiales y Métodos	16
7. Resultados	21
8. Resultados Adicionales	66
9. Discusión	77
10. Bibliografía	82

1. ABREVIATURAS

AD	→	Dominio de ATPasa
ADP	→	Adenosin difosfato
ATP γ S	→	Adenosin 5'-[γ -tio]-trifosfato
ATP	→	Adenosin trifosfato
AS	→	Ácido siálico
BHK	→	Células de riñón de hámster bebé
BSA	→	Albúmina
Caco	→	Células de carcinoma de colón
CMLA	→	Carboximetil- α -lactalbumina
Da	→	Daltones
DLP	→	Partículas de doble capa
DTT	→	Ditiotreitol
EDTA	→	Ácido etilendiaminotetracético
ffu	→	Unidades formadoras de placa
GM1	→	Gangliósido
GM3	→	Gangliósido
Gravy	→	Promedio de hidropaticidad
HA	→	Hemaglutinación
Hep2	→	Células de carcinoma de laringe
Hsc	→	Proteína constitutiva de choque térmico
Hsp	→	Proteína de choque térmico
K _D	→	Constante de disociación
<i>l</i>	→	<i>levo</i>
M	→	Molaridad
MAb	→	Anticuerpo monoclonal
M β CD	→	metil- β -ciclodextrina
MEM	→	Medio mínimo esencial de Eagle
ND	→	No determinado
min	→	Minutos
MOI	→	Multiplicidad de infección
mRNA	→	Ácido ribonucleico mensajero
NA	→	Neuroaminidasa
NSP	→	Proteína no estructural

PBD	→	Dominio de unión a ligandos
PBS	→	Solución salina de buffer de fosfatos
RH	→	Región hidrofóbica
RNA	→	Ácido ribonucleico
RRV	→	Rotavirus rhesus
T	→	Número de triangulación
TCA	→	Ácido tricloroacético
TLP	→	Partículas de tres capas
SDS	→	Dodecilsulfato de sodio
VP	→	Proteína viral
wtHsc	→	Proteína hsc70 silvestre

2. RESUMEN

Se describió que la proteína constitutiva de choque térmico, hsc70, participa como un receptor de post-unión para rotavirus. En este trabajo mostramos que hsc70 interacciona de manera específica con rotavirus, a través de su dominio de unión a ligandos, ya que la proteína recombinante completa y su dominio de unión a ligandos, pero no su dominio de ATPasa se une a TLPs en un ensayo en fase-sólida y que ligandos conocidos de hsc70 pueden competir esta unión. También mostramos que ligandos de hsc70 bloquean la infección de rotavirus, cuando se adicionan a las células antes de la infección viral, sugiriendo que la hsc70 que se encuentra en la membrana de las células también interacciona con el virus a través de su dominio de unión a ligandos y que esta interacción es importante para la entrada del virus. Cuando virus infecciosos purificados se incuban en solución con hsc70, en presencia de ATP y la co-chaperona hsp40, y se pasa por un colchón de sacarosa, el virus que se recupera ha perdido 60% de su infectividad y la hsc70 no se detecta en esta fracción. Estos virus tratados con hsc70 muestran una ligera diferencia en su reactividad con algunos anticuerpos monoclonales, así como una mayor susceptibilidad al calor y a pH básicos, comparados con los virus no tratados, sugiriendo que la hsc70 induce un cambio conformacional en el virus que resulta en una disminución en su infectividad. La importancia de la actividad de ATPasa de hsc70 para reducir la infectividad del virus se demostró cuando encontramos que en presencia de un análogo de ATP no hidrolizable, la infectividad del virus no se afecta y que una mutante que tiene afectada su actividad de ATPasa tampoco afecta la infectividad del virus. Juntos todos estos resultados sugieren que durante la infección de las células la interacción del virus con hsc70 en la superficie de las células MA104 resulta en un cambio conformacional de la partícula viral que facilita su entrada al citoplasma celular.

3. SUMMARY

The heat shock cognate protein, hsc70, has been implicated as a post-attachment cell receptor for rotaviruses. Here we show that hsc70 interacts specifically with rotavirus through its peptide-binding domain, since a recombinant full-length hsc70 protein and its peptide-binding domain, but not its ATPase domain, bound TLPs in a solid-phase assay, and known ligands of hsc70 competed this binding. The peptide ligands of hsc70 were also shown to block rotavirus infectivity when added to the cell before virus infection, suggesting that hsc70 on the surface of MA104 cells also interacts with the virus through its peptide-binding domain, and this interaction is important for virus entry. When purified infectious virus was incubated with soluble hsc70 in the presence of co-chaperone hsp40 and ATP, and then pelleted through a sucrose cushion, the recovered virus had lost 60% of its infectivity, even though hsc70 was not detected in the pellet fraction. The hsc70-treated virus showed a slightly different reactivity with monoclonal antibodies, and was more susceptible to heat and basic pH, as compared to the untreated virus, suggesting that hsc70 induces a subtle conformational change in the virus that results in reduction of its infectivity. The relevance of the ATPase activity of hsc70 for reducing virus infectivity was demonstrated by the finding that in the presence of a nonhydrolysable analogue of ATP the virus infectivity was not affected, and a mutant protein lacking ATPase activity failed to reduce virus infection. Altogether, these results suggest that during cell infection the interaction of the virus with hsc70 on the surface of MA104 cells results in a conformational change of the virus particle that facilitates its entry into the cell's cytoplasm.

4. INTRODUCCIÓN

* Generalidades

Los rotavirus son la causa más importante de deshidratación y diarrea severa en niños menores de 3 años. Son responsables de aproximadamente 600,000 muertes al año en todo el mundo (59), donde el 82% de las muertes ocurre en países en vías de desarrollo, principalmente por las carencias en los servicios de salud y la ausencia de tratamiento (59). Se estima que cada niño, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, es infectado por rotavirus antes de que cumpla los cinco años (58). La diarrea por rotavirus representa un problema de salud a nivel mundial y el desarrollo de una vacuna se ha vuelto una prioridad para la Organización Mundial de la Salud.

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae* y están compuestos por tres capas concéntricas de proteínas que envuelven un genoma de RNA de doble cadena, que codifica para 12 proteínas. Seis de estas proteínas son estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y por lo tanto forman parte de la partícula viral, mientras que las otras seis (NSP1 a NSP6) son no estructurales y se encuentran únicamente en células infectadas, pero no se incorporan al virión maduro. Algunas de las proteínas virales sufren modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, fosforilación, o cortes proteolíticos (18, 19).

Las partículas virales tienen aproximadamente 75 nm de diámetro, con una geometría icosaédrica con simetría de $T=13/1$ (62, 84). En la partícula madura, la capa externa del virión está formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7, estructurada como trimeros. De esta capa, de apariencia lisa, se proyectan 60 espículas de ~12 nm de longitud constituidas por dímeros de la proteína VP4 (Fig. 4.1) (83). La base de estos dímeros se localiza por debajo de la capa de VP7, e interacciona ampliamente con VP6, la proteína que forma la capa intermedia del virión, la cual está formada por 260 trímeros de esta proteína que es la más abundante del virus y constituye aproximadamente el 50% de la proteína total del virión (12). La capa intermedia, a su vez, rodea la capa más interna, o nucleocápside, que está formada por 60 dímeros de la proteína VP2, la cual envuelve al genoma viral (Fig. 4.1) (62). En el interior de esta nucleocápside se encuentran también doce copias de cada una de las proteínas VP1 (RNA polimerasa) y VP3 (guanililtransferasa). Se ha demostrado que los complejos de estas dos proteínas se

encuentran asociados a la cara interna de la capa de VP2, en cada uno de los 12 vértices del icosaedro con simetría de 5, donde se ha propuesto que llevan a cabo su función de transcribir y modificar los mRNAs virales y de replicar los genes del virus (18, 63).

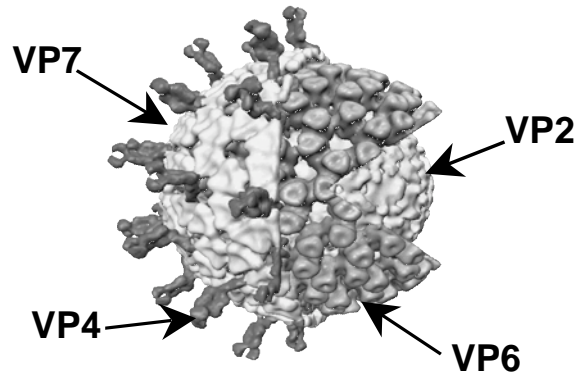


Fig. 4.1. Reconstrucción tridimensional de una partícula de rotavirus con tres capas de proteínas, obtenida por criomicroscopía electrónica. Una parte de la capa externa e intermedia se removieron virtualmente para mostrar la estructura interna del virus. Esta imagen fue generosamente proporcionada por el Dr. BVV Prasad, de Baylor College of Medicine, de Houston, Texas

Las proteínas de la capa externa, VP7 y VP4, tienen un papel importante durante las primeras interacciones del virus con la superficie de la célula, siendo responsables de la unión y de la penetración del virus (18). Para ser infeccioso el virus depende del corte proteolítico con tripsina de la proteína VP4 (776 aminoácidos), en la subunidad VP8 (aminoácidos 1 a 231) y VP5 (aminoácidos 248 a 776) (3) (Fig. 4.2); este corte no afecta la unión del virus a la superficie celular, pero es necesario para la entrada del virus a la célula (3, 47).

Los rotavirus tienen un tropismo muy específico, ya que *in vivo* infectan principalmente enterocitos de las vellosidades del intestino delgado (43). Sin embargo, en cultivo se ha visto que pueden unirse a una gran variedad de líneas celulares, aunque sólo infectan células epiteliales de origen renal o intestinal (18, 19). Esto sugiere que la unión de rotavirus a la célula es promiscua y que su penetración al citoplasma depende de un paso posterior a la unión del virus a la superficie celular. Los rotavirus inician su ciclo de infección mediante el reconocimiento de receptores específicos en la membrana de su célula huésped, estos receptores les permiten acceder al citoplasma mediante un

mecanismo que no es totalmente claro. Durante este paso, los rotavirus pierden las proteínas de la capa externa; este evento señala el inicio de la transcripción viral. Los RNAs mensajeros se utilizan para la síntesis de proteínas virales y como plantados en la replicación del genoma. La replicación y la morfogénesis de las partículas virales inmaduras ocurre en regiones electrodensas del citoplasma, compuestas por proteínas y material genético virales, los cuales se denominan viroplasmos. Las partículas inmaduras, con dos de las tres capas de proteínas geman hacia el retículo endoplásmico, adquiriendo una membrana lipídica transitoria; esta membrana es sustituida por las proteínas virales VP7 y VP4, dando como resultado la formación de partículas virales maduras. Finalmente los viriones maduros son liberados mediante lisis celular (18).

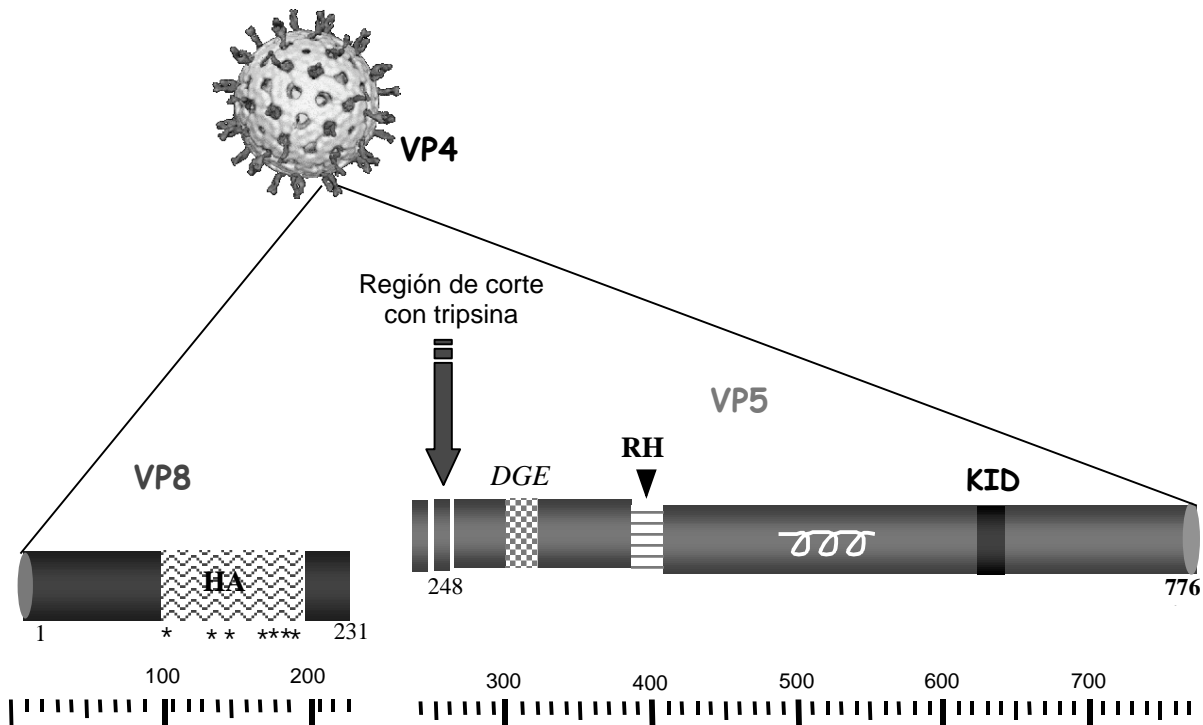


Fig. 4.2. Esquema de las características estructurales de la proteína de la capa externa de rotavirus, VP4. Se muestra la región de corte con tripsina entre los aa 231 a 248, que genera las dos subunidades, VP8 y VP5. En la subunidad VP8 se muestra el dominio de hemaglutinación (HA). Los asteriscos en esta región indican los aa importantes para la unión a ácido siálico: aa 101, 144, 155 y del 187 al 190. En la subunidad VP5 se muestran las posiciones de las secuencias DGE y KID, que son motivos de unión a la integrina $\alpha 2\beta 1$ y a la proteína Hsc70, respectivamente. RH indica la región hidrofóbica la cual ha sido propuesta como un posible péptido de fusión. El espiral blanco indica una región de coiled-coil.

* Interacciones virus-receptor

La interacción inicial de un virus con sus receptores celulares da lugar a una serie de eventos dinámicos que finalmente le permiten al virus entrar en el citoplasma de la célula. La interacción virus receptor es en si misma un proceso de varios pasos, pero además, los virus pueden utilizar distintos receptores de manera secuencial, o bien un grupo diferente de ellos dependiendo del tipo celular que estén infectando. Se ha encontrado que virus de distintas familias utilizan cuando menos dos tipos de receptores para infectar a su célula huésped: un receptor de unión, que generalmente le permite al virus anclarse de manera rápida a la superficie celular y un segundo tipo de receptor que le permite la entrada a la célula, a estos receptores se les ha llamado co-receptores, receptores post-unión, de entrada, de fusión, de internalización o secundarios dependiendo de la función que se conoce que tengan durante el proceso de infección del virus. En este trabajo les llamaremos receptores de post-unión (47, 74).

La entrada de los rotavirus a la célula es un proceso que ocurre a través de múltiples pasos, con interacciones secuenciales entre las proteínas de superficie del virus y varias moléculas en la superficie celular (Fig. 4.3) (47). El proceso de entrada de los rotavirus ha sido caracterizado en células de epitelio de riñón de mono, MA104, que son susceptibles a la infección del virus. La infectividad de algunas cepas de origen animal en esta línea celular es sensible al tratamiento con neuraminidasa (NA), lo cual indica que es necesaria la presencia de ácido siálico (AS) en la superficie celular para que estos virus puedan infectar (26). En contraste, la infectividad de otras cepas de origen animal, y muchas aisladas de origen humano, es resistente a NA (11); sin embargo, esto no significa que estas cepas no se unan a AS, ya que algunas estructuras de oligosacáridos que contiene AS son poco o no sensibles a las NAs comúnmente empleadas (17). Las cepas que son NA-sensibles interactúan con un primer receptor en la membrana celular que contiene ácido siálico (AS), a través de la subunidad VP8 de la proteína VP4, en la región comprendida entre los aminoácidos 93 y 208, donde se sabe que algunos de estos residuos (R101, V144, Y155, K187, Y188, Y189 y S190) son esenciales para la unión con AS (Fig. 4.2) (37). Se ha sugerido que los gangliósidos GM1 y GM3 son los responsables de esta unión (33, 68). Se sugiere que esta primera interacción con AS induce un cambio conformacional en VP4 que permite que el virus interaccione con la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través del motivo DGE, comprendido entre los aminoácidos 308 y 310 de VP4, en la subunidad VP5 (Fig. 4.2) (86). Se ha reportado que para las cepas NA-resistentes la

integrina $\alpha 2\beta 1$ puede ser utilizada como un receptor de unión a la célula, sugiriendo esto que la integrina $\alpha 2\beta 1$ puede funcionar como receptor de unión o post-unión dependiendo de la cepa viral (29, 47).

En ensayos de competencia de infección a la célula entre los rotavirus RRV, su variante resistente a NA (nar3) y la cepa de origen humano Wa (resistente a NA), se vio que estas distintas cepas comparten la interacción con al menos una molécula receptora, en un paso posterior a su unión (50). Nuestro grupo reportó que la integrina $\alpha v\beta 3$ tiene un papel importante en la infección de los tres virus en un paso posterior a la unión, ya que anticuerpos contra la integrina $\alpha v\beta 3$ no son capaces de inhibir la unión de ninguno de los tres virus a la célula, sin embargo, si inhiben su infección. Esta interacción pudiera estar mediando la penetración del virus a la célula, sin embargo no ha sido totalmente caracterizada (32).

Nuestro grupo también encontró que la proteína hsc70 participa en las primeras interacciones de los tres virus mencionados anteriormente con la célula, y que lo hace también en un paso posterior a la unión (30). A pesar de que la proteína de choque térmico hsc70 no tiene una secuencia de señal de exportación, por citometría de flujo e inmunofluorescencia se detectó que hsc70 está presente en la superficie de varias líneas celulares como Caco2 y MA104 que son susceptibles para rotavirus y otras menos susceptibles como BHK y Hep2 (30, 51). Por ensayos de ELISA se demostró que el virus interacciona directamente con la proteína recombinante hsc70. Además, se demostró que anticuerpos monoclonales dirigidos contra hsc70 bloquean la infección del virus y no la unión cuando se preincuba con las células antes de la infección viral. También, la proteína recombinante hsc70 preincubada con el virus es capaz de inhibir la infección y no la unión del virus a la célula y se demostró que cuando los anticuerpos contra hsc70 se adicionan a las células después de que el virus se ha unido a la superficie celular a 4°C, estos anticuerpos son todavía capaces de inhibir la infección del virus. Todo esto indica que el virus interacciona con la proteína hsc70 y esto se da en un paso posterior a la unión del virus con la célula huésped (30). Se ha determinado que el virus interacciona con la proteína hsc70 a través de un dominio en la subunidad VP5, localizado entre los aminoácidos 642 a 658 (Fig. 4.2) (85).

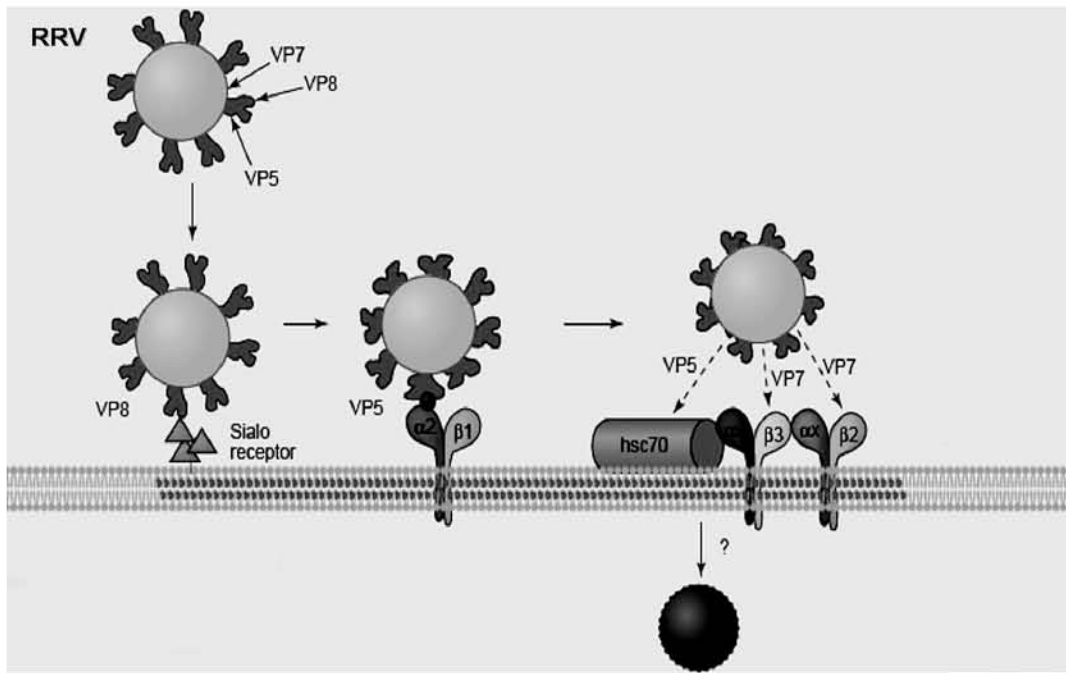


Fig. 4.3. Modelo de las primeras interacciones de rotavirus. El rotavirus RRV se une inicialmente a un receptor que contiene AS, a través de la subunidad VP8 de la proteína VP4. Después de esta primera interacción, que se sugiere produce un cambio conformacional en VP4, el virus se une a un segundo receptor, la integrina $\alpha_2\beta_1$. Esta interacción es mediada por el tripéptido DGE presente en la subunidad VP5 (aa 308-310 de VP4). Esta segunda interacción podría facilitar las interacciones posteriores con la integrina $\alpha\beta_3$ y con la proteína de choque térmico hsc70; estas interacciones están mediadas por la región CNP de VP7 (aa 161-167), para la integrina $\alpha\beta_3$, y por la región del péptido KID de VP5 (aa 642-658), con hsc70. Todos estos receptores se localizan en microdominios lipídicos en la membrana de la célula huésped, conocidos como "rafts"

* Entrada del virus a la célula

Se han descrito diferentes moléculas celulares como receptores para la entrada de rotavirus a su célula (Fig. 4.3); sin embargo, el mecanismo de entrada no se conoce claramente. Se había propuesto que rotavirus podía entrar a la célula a través de la membrana celular por penetración directa, o por endocitosis mediada por receptor (27, 42, 60, 65, 69). Pero recientemente se describió que los rotavirus entran a la célula a través de endocitosis independiente de clatrina y de caveolas, en un proceso dependiente de dinamina (73). También se encontró que la depleción de colesterol de la membrana celular con metil- β -ciclodextrina (M β CD) afecta drásticamente la infectividad del virus, afectando la unión de las partículas a la célula (32), esto sugiere que los microdominios lipídicos de la membrana enriquecidos con esfingolípidos y colesterol, normalmente

llamados “rafts” (8, 75), participan en la entrada de los virus a la célula (1, 32, 46). Además, se encontró que el gangliosido GM1 y las subunidades de las integrinas $\alpha 2$ y $\beta 3$, así como la proteína hsc70, se encuentran asociadas a los rafts (38), y que el rotavirus RRV se asocia también a estos microdominios a tiempos tempranos de la infección (38).

* La proteína Hsc70

Hsc70 es un miembro constitutivo de la familia de proteínas de choque térmico Hsp70. Las proteínas de esta familia se han conservado evolutivamente, pero no tienen funciones intercambiables. La diversidad de las funciones de las chaperonas moleculares de la familia de Hsp70 es resultado de la variación en la habilidad de unir diferentes proteínas (24). En general las proteínas de la familia de Hsp70 están asociadas a varias funciones, incluyendo el plegamiento de proteínas, la translocación a través de membranas, así como la formación y disociación de complejos oligoméricos. En particular, hsc70 se ha asociado a la translocación de proteínas a través de las membranas de organelos, se une a péptidos nacientes y disocia clatrina de las vesículas endocíticas (53).

Durante una infección viral en células animales, se ha reportado que las células sufren alteraciones como resultado de una respuesta de estrés celular, evidenciadas por un aumento y relocalización de las proteínas de choque térmico de las familias de Hsp60, Hsp70 y Hsp90, dependiendo del tipo de virus y de la célula huésped (40). En algunos casos, la respuesta de estrés de la célula favorece la replicación del virus. Así, se han reportado interacciones directas entre proteínas virales y proteínas de estrés que favorecen algún paso del ciclo de la replicación viral, y se ha encontrado que en algunos casos las proteínas de estrés se incorporan a los viriones maduros (70, 76). En particular se sabe que hsp70 y hsc70 interactúan con proteínas de la cápside de Sindbis virus (52) y participan en su ensamblaje de la cápside. Se ha encontrado que hsc70 se asocia a la proteína precursora de la cápside de poliovirus, P1, y B1 de coxsackie virus (49), e interactúa también con las proteínas VP1, VP2 y VP3 de poliovirus, facilitando su transporte nuclear y previniendo un ensamble prematuro (13). Se requiere de las proteínas de la familia de Hsp70 para el plegamiento de la proteína G del virus de estomatitis vesicular (35). Hsp70 está involucrada en el ensamblaje del virus vaccinia (39) y también participa en la morfogénesis del virus de hepatitis B (61). Hsc70 interactúa con el antígeno T de SV40 a través de su dominio J, y esta interacción ayuda a la replicación del

DNA y al ensamblaje del virión (72). Hsc70 también se ha encontrado que se asocia con el hexón de la cápside viral de adenovirus y ayuda en el transporte al área perinuclear y que actúa como receptor celular para HTLV-1 (human T-lymphotropic virus 1), en la formación de sincicios (71). Otra proteína de la familia, grp78, que normalmente se encuentra en retículo endoplásmico, se asocia al complejo mayor de histocompatibilidad clase I y actúa como receptor de coxsackie virus (78). Junto con hsp90, hsp70 forma un complejo que sirve como receptor en la entrada de virus dengue en líneas celulares humanas como monocitos y macrófagos (67). La interacción de la proteína L2 de papilloma virus con hsc70, ayuda al ensamble de la partícula viral (23). Para citomegalovirus el aumento en la expresión de hsc70 favorece el crecimiento del virus, ya que participa en la maduración y transporte de los viriones, además de proteger a las células infectadas del mecanismo de defensa (55).

Se sabe que las familias de proteínas de choque térmico son esencialmente núcleo-citoplásmicas, sin embargo, se ha reportado que hsc70 y otras proteínas de choque térmico están presentes en la superficie de células de líneas tumorales, y en células infectadas por virus, así como en células espermatozógenas de mamífero, en células epidermales, en monocitos y en células B (7, 21, 51). El tipo de asociación que hsc70 establece en la superficie de las células no se conoce, sin embargo, se ha observado que hsc70, hsp70 y otras proteínas de estrés interactúan con receptores específicos en células presentadoras de antígenos (5). También se sabe que hsc70 puede interactuar con lípidos, incluso se ha visto que la proteína es capaz de formar canales catiónicos en membranas de fosfolípidos (4).

Hsc70 está formada por dos dominios estructurales, cada uno de los cuales tiene una función definida. El extremo amino-terminal (44 kDa) contiene un sitio de unión a nucleótidos y presenta actividad de ATPasa. El dominio carboxilo-terminal tiene el sitio de unión a ligandos (30 kDa) (Fig. 4.4), y forma un bolsillo que es importante en la interacción específica con los sustratos (81). El dominio de ATPasa (AD) está más conservado que el de unión a ligandos (PBD) (25). La unión y liberación de los polipéptidos es regulada por la unión e hidrólisis de ATP; la velocidad de intercambio de ATP es regulada a su vez por la unión de las co-chaperonas. La unión al ligando estimula la hidrólisis de ATP, y se sabe que la concentración de K^+ también juega un papel importante en la hidrólisis de ATP (80) y en la actividad chaperona de hsc70 (22, 48). Las proteínas chaperonas tienen un

sistema de regulación de su actividad, dado por la interacción con proteínas conocidas como co-chaperonas. Para el caso de hsc70, se sabe que la proteína hsp40 estimula su actividad de ATPasa, mientras que la acción concertada de las co-chaperonas hip y hop regula la interacción entre hsc70 y su sustrato. Hip se une al dominio de ATPasa y estabiliza la unión con el sustrato, mientras que hop estimula la unión con ATP, y por lo tanto la disociación del sustrato para el reciclaje de hsc70 (50).

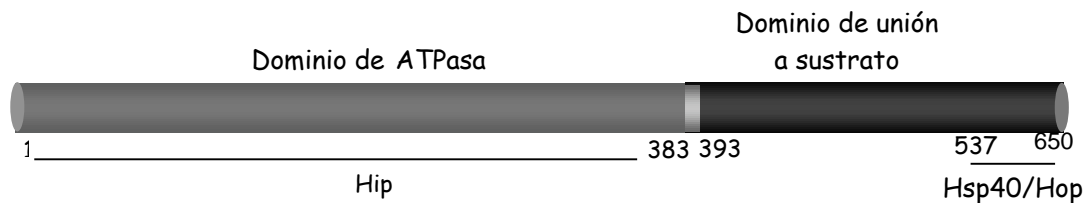


Fig. 4.4. Diagrama de los dominios estructurales de la proteína hsc70. Se muestra que el dominio de ATPasa es del aa 1 al 383, mientras que el de unión a sustrato es del aa 393 al 650. Las proteínas hsp40 y hop se une al extremo carboxilo entre los aa 537 y 650. La proteína hip se une el dominio de ATPasa.

En el presente trabajo quisimos determinar el dominio de hsc70 involucrado en la unión a los rotavirus, y si esta interacción con hsc70 le sirve al virus sólo de anclaje en la membrana celular durante su paso al interior de la célula, o si la función de chaperona de hsc70 participa en este proceso. Encontramos que los rotavirus se unen al dominio de unión a ligandos de hsc70, de forma específica, y que la función de chaperona se activa durante la interacción, lo que resulta en un cambio conformacional en las proteínas del virus que, probablemente, en el contexto de una infección, facilite la entrada del virus al citoplasma.

5. OBJETIVOS

* General

Caracterizar la función de la proteína hsc70 en la entrada de rotavirus a la célula.

* Particulares

1. Caracterizar la unión de hsc70 con el virus.

1.1 Mapear el dominio de hsc70 que interacciona con el virus.

1.2 Determinar la especificidad de la unión entre el virus y hsc70.

2. Determinar si la actividad de chaperona de hsc70 es importante para la infección del virus.

2.1 Evaluar si la interacción del rotavirus con hsc70 depende de ATP.

2.2 Evaluar si la interacción virus-hsc70 requiere o es modulada por la presencia de co-chaperonas.

2.3 Evaluar la capacidad de infección del virus después de su interacción con hsc70.

2.4 Determinar si la actividad de chaperona de hsc70 modifica la conformación del virus.

2.5 Determinar si la infección de distintas cepas requiere la interacción con hsc70.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

* Células y virus.

La línea celular MA104, derivada de epitelio de riñón de mono rhesus, propagada en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino. La cepa de rotavirus RRV, aislada de un mono rhesus, se obtuvo del laboratorio del Dr. H. B. Greenberg, de la Universidad de Stanford, California. La cepa RRV se propagó en células MA104 (57). La purificación de partículas virales se hizo utilizando gradientes de CsCl (86).

* Proteínas y péptidos.

La proteína hsc70 de origen humano, se obtuvo por expresión del gene correspondiente (donado por R. T. Morimoto, de la Universidad de Northwestern, Evanston, IL.) en *E. coli*. Sus dos dominios, el de unión a ligandos (PBD) y de ATPasa (AD), se sub-clonaron en el vector de expresión pET28 (Novagene) como una fusión a seis histidinas en el carboxilo-terminal. La mutante K71M (54) se hizo con el kit de Mutagénesis Sitio-Dirigido Quick Change (Promega). Todas las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con el sistema AKTA (Pharmacia). Para remover los nucleótidos que viene asociados a la proteína purificada, la proteína hsc70 fue tratada con 10 mM EDTA por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la proteína se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 75 % de saturación, se disolvió y dializó en PBS, para eliminar el exceso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La hsc70 pura y libre de nucleótidos se mantuvo a 4°C, condición en la que permanece estable por varios meses. Los péptidos usados (Tabla 1) durante este trabajo fueron sintetizados químicamente por Invitrogen y usados a las concentraciones indicadas en cada experimento.

* Ensayo de renaturalización de luciferasa.

La luciferasa de luciérnaga (0.5 mg/ml, Sigma) se desnaturalizó por incubación en buffer B (6 M cloruro de guanidina, 50 mM KCH_3COO , 25 mM Hepes, 5 mM DTT, pH 7.2) durante 60 min a temperatura ambiente. La proteína desnaturalizada se diluyó 40 veces

en buffer C (50 mM KCH₃COO, 25 mM Hepes, 5 mM DTT, 1 mg/ml BSA, pH 7.2). Para la renaturalización, las muestras se diluyeron 25 veces en buffer D (120 mM KCH₃COO, 28 mM Hepes, 1.2 mM Mg(CH₃COO)₂, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mg/ml BSA, pH 7.5) en presencia o ausencia de las chaperonas, 1.7 μM hsc70 y 0.5 μM DnaJ, y se incubaron 90 min. Se tomó 1 μl de la mezcla de reacción, se mezcló con 50 μl de sustrato y se midió la cantidad de luz producida. El 100 % es la cantidad de luz que produce la misma cantidad de luciferasa nativa, en buffer C (10).

Tabla 1. Secuencia de los péptidos sintéticos utilizados en este trabajo

Péptido	Secuencia	K _D (μM)	Gravy*
C	KLIGVLSSLFRPC	2.6	1.031
A	FYQLALT	2.2	0.957
KID	KTKIDRSTQISPNTLPD	ND	-1.200
Control	INNDEVFEAGTDGRY	ND	-1.000

* Promedio de hidropaticidad

* Unión a Hsc70.

Se hicieron ensayos de ELISA para estudiar la interacción entre rotavirus y hsc70. Placas de ELISA de 96 pozos (Costar) se sensibilizaron con un anticuerpo de cabra contra rotavirus (diluido 1:10000), como anticuerpo de captura. Se añadieron con 200 μl de una solución de BSA al 1% en PBS por cada pozo y la placa se incubó durante 120 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 200 ng de virus por pozo y se incubó por 60 min a 37°C. La placa se lavó y se incubó con las cantidades indicadas de proteína recombinante o péptido por 60 min a 37°C. La cantidad de hsc70 o sus dominios unida a rotavirus, se determinó usando un anticuerpo policlonal de conejo contra hsc70 (diluido 1:2000). Finalmente se usó el correspondiente anticuerpo conjugado de fosfatasa alcalina anti-inmunoglobulina en una dilución 1:1500 y se añadió el sustrato Sigma 104 (1 mg/ml) diluido en buffer de dietanolamina (100 mM dietanolamina [pH 9.4], 1 mM MgCl₂, 5 mM de azida de sodio). La absorbancia se obtuvo a 405 nm utilizando un Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek Instruments).

* Ensayos de infectividad.

Células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos, se lavaron dos veces con MEM, y se incubaron con diferentes cantidades de péptido o proteína recombinante por 30 min a 37°C. Después se incubaron con 2000 unidades formadoras de focos (ffu) del virus RRV activado el cual se adsorbió por 60 min a 37°C. Después del período de adsorción, se quitó el virus y se lavaron las células dos veces con MEM y se dejó proceder la infección por 14 horas a 37°C. Las células infectadas se fijaron con acetona al 80% y se inmunotñieron las monocapas con un anticuerpo dirigido contra rotavirus (2). Las ffu se contaron con la ayuda de una estación Visiolab 1000 (31).

* Ensayos en solución.

Se incubaron 1600 ng de hsc70 con 1 mM de ATP, ADP o ATP γ S por 15 min a temperatura ambiente. La proteína hsc70 cargada con diferentes nucleótidos se incubó posteriormente con 1200 ng de virus en PBS, o en condiciones de renaturalización con 50 μ M de DnaJ, por 90 min a 37°C. Después de la incubación las muestras se pasaron a través de un colchón de sacarosa (40% de sacarosa, 0.01% BSA en PBS), centrifugando 40 min a 25 psi a 4°C en una centrifuga de aire (Airfuge, Beckman). El material que sedimentó a través de la sacarosa se disolvió en PBS y se usó para hacer ensayos de infectividad, inmunoblots o reactividad con anticuerpos por ELISA.

* Ensayos de reactividad con anticuerpos.

Placas de ELISA de 96 pozos (Costar) se sensibilizaron con un anticuerpo de cabra contra rotavirus (diluido 1:10000), como anticuerpo de captura, y se agregaron a cada pozo 200 ng de virus tratado o no con hsc70, y la placa se incubó 60 min a 37°C. Para evitar un pegado inespecífico, 200 μ l de una solución de BSA al 1% en PBS se incubó sobre la placa 120 minutos a 37°C. La placa se lavó y se usaron ocho diferentes anticuerpos para ver el virus, tratando de evaluar un cambio de reactividad con el virus tratado con hsc70. Los anticuerpos que se usaron fue un policlonal de conejo contra el virus (α TLPs 1:4000), un policlonal de conejo contra el carboxilo terminal de VP5 (474 1:4000), un monoclonal contra VP8 (7A12 1:800), dos monoclonal contra VP5 (2G4 1:800

y HS2 1:100) y tres monoclonales contra VP7 (159 1:400, 60 1:100 y 4F8 1:800). Estos anticuerpos se incubaron 60 min a 37°C y posteriormente se añadió el correspondiente anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y su sustrato. La absorbancia se leyó a 405 nm.

* Ensayos de permeabilización.

Monocapas confluentes de células MA104, cultivadas en cajas de 96 pozos se infectaron con 1, 2, 4 y 8 ffu de virus activado con tripsina, en presencia de 2 mg/ml de péptido y 150 mg/ml de α -sarcina. Después de 60 min de adsorción a 37°C, se retiró la mezcla de las células y se adicionó medio fresco por 30 min. Después de este tiempo, se reemplazó el MEM por medio sin metionina por 5 min, para posteriormente reemplazar este medio con medio sin metionina suplementado con 25 μ Ci/ml de Met y Cis 35 S (mezcla EXPRE 35 S 35 S >1000 Ci/mmol), incubándose 60 min a 37°C. Después del periodo de marcaje, las células se lavaron con PBS, se trataron 5 min a temperatura ambiente con 5 % ácido tricloroacético (TCA) y se lavan tres veces con etanol. Se dejó secar la monocapa de células y se agregaron 50 μ l de 0.1% dodecil-sulfato de sodio (SDS) en 0.1 N de NaOH. Las muestras se solubilizan en líquido de centelleo Ecolite (ICN) y se detectó la cantidad de radioactividad incorporada en un contador de centelleo (Beckman) (14).

* Ensayos de Inmunofluorescencia

Monocapas confluentes de células MA104 crecidas sobre cubreobjetos de vidrio en cajas de 48 pozos (C48 Costar), se fijaron con 2% de paraformaldehído (Sigma) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con una solución de BSA al 1% en PBS-NH₄Cl durante 60 min a temperatura ambiente para evitar un pegado inespecífico. Posteriormente se incubaron 2 mg/ml de péptido C, péptido control o péptido B6 por 60 min a temperatura ambiente y después se incubaron con el anticuerpo B6 en una dilución de 1:10 en 0.1% de BSA en PBS-NH₄Cl durante 60 min a temperatura ambiente. Finalmente se incubaron con el anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón acoplado con Alexa 488 (Molecular Probes) con una dilución 1:100 y se montaron en portaobjetos. Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Eclipse E600, Nikon), y las imágenes se procesaron utilizando el programa ACT-1.

* Inmunoblot

Las proteínas recuperadas en los sedimentos de las muestras centrifugadas a través de los colchones de sacarosa, se separaron en geles de poliacrilamida–dodecil sulfato de sodio y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bredford, MA). Las membranas se bloquearon con una solución de leche en polvo baja en grasas al 5 % en PBS, y se incubaron a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-rotavirus y un anticuerpo contra hsc70 diluido en PBS con 0.01% de leche, seguido de una incubación con un suero anti-inmunoglobulina especie-específica, conjugado con peroxidasa. La actividad de peroxidasa se desarrolló con el kit de quimioluminiscencia Western Lightning de Perkin Elmer Life Sciences, siguiendo las instrucciones de manufactura.

* Efectos de pH y temperatura en ensayos de infectividad

Las TLPs incubadas con hsc70, pasadas a través de un colchón de sacarosa, como se describió previamente, se incubaron en soluciones de PBS con diferentes pHs, ajustando con HCl o NaOH según fuera el caso (pH 2, 2.5, 3, 3.5, 4 – 8, 8.5, 9, 9.5) por 60 min a 37°C, y después las muestras se diluyeron 10 veces en MEM sin suero (20). Para evaluar el efecto de la temperatura, las TLPs tratadas con hsc70 se incubaron por 20 min a 37, 40, 45 y 50°C en PBS. Después de los tratamientos de pH y temperatura, los virus se adsorbieron en monocapas confluentes de células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos, durante 60 min a 37°C. Después del período de adsorción, se quitó el virus y se lavaron las células dos veces con MEM y se dejó proceder la infección por 14 horas a 37°C. Las células infectadas se fijaron y se hizo una inmunotinción con un anticuerpo dirigido contra rotavirus (2). Como control se usaron TLPs tratadas en las mismas condiciones, sin incubar con hsc70.

7. RESULTADOS

* Artículo aceptado en *Journal of Virology*

The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity

The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity

Jimena Pérez-Vargas, Pedro Romero, Susana López, and Carlos F. Arias*

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

Running title: Rotavirus interaction with hsc70

Keywords: rotavirus, hsc70, virus entry, ATPase, virus receptor

*Corresponding author mailing address: Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. Phone: (52) (777) 3114701 Fax: (52) (777) 3172388. E-mail: arias@ibt.unam.mx

Abstract

The heat shock cognate protein, hsc70, has been implicated as a post-attachment cell receptor for rotaviruses. Here we show that hsc70 interacts specifically with rotavirus through its peptide-binding domain, since a recombinant full-length hsc70 protein and its peptide-binding domain, but not its ATPase domain, bound TLPs in a solid-phase assay, and known ligands of hsc70 competed this binding. The peptide ligands of hsc70 were also shown to block rotavirus infectivity when added to the cell before virus infection, suggesting that hsc70 on the surface of MA104 cells also interacts with the virus through its peptide-binding domain, and this interaction is important for virus entry. When purified infectious virus was incubated with soluble hsc70 in the presence of co-chaperone hsp40 and ATP, and then pelleted through a sucrose cushion, the recovered virus had lost 60% of its infectivity, even though hsc70 was not detected in the pellet fraction. The hsc70-treated virus showed a slightly different reactivity with monoclonal antibodies, and was more susceptible to heat and basic pH, as compared to the untreated virus, suggesting that hsc70 induces a subtle conformational change in the virus that results in reduction of its infectivity. The relevance of the ATPase activity of hsc70 for reducing virus infectivity was demonstrated by the finding that in the presence of a nonhydrolysable analogue of ATP the virus infectivity was not affected, and a mutant protein lacking ATPase activity failed to reduce virus infection. Altogether, these results suggest that during cell infection the interaction of the virus with hsc70 on the surface of MA104 cells results in a conformational change of the virus particle that facilitates its entry into the cell's cytoplasm.

Introduction

Rotaviruses are the single most important cause of severe dehydrating diarrhea in young children worldwide. These nonenveloped viruses are formed by a triple-layered protein capsid which surrounds the genome composed by eleven segments of double stranded RNA(11). The outermost layer, which is responsible for the initial interactions of the virus with the cell surface, consists of two proteins: VP7, a glycoprotein that forms the smooth surface of the virion, and VP4, which forms the spikes that extend from the surface of the virus particle. Both proteins play essential roles during the early interactions of the virus with the cell surface, including receptor binding and cell penetration (11, 29). To be infectious, rotaviruses depend on the proteolytic cleavage of VP4 (776 amino acids) into subunits VP8 (amino acids 1 to 247) and VP5 (amino acids 248 to 776); this cleavage does not affect cell binding, but is required for the entry of the virus into the cell's cytoplasm (17, 25, 29). Rotaviruses have a very specific cell tropism, infecting primarily the mature enterocytes at the tips of the villi of the small intestine, and the susceptibility of these cells seems to be limited to a narrow age window(26). In cell culture, rotavirus binds to a large variety of cell types, although it only infects efficiently some of them, including those of renal and intestinal origin (6, 11, 12). Rotavirus infection seems to be a multistep process in which the virus has to interact with several cell surface molecules to enter the cell (29). We have previously shown that the neuraminidase-sensitive simian rotavirus strain RRV initially attaches to a sialic acid-containing cell molecule through the VP8 subunit of VP4, and then subsequently interacts with integrin $\alpha 2\beta 1$ through VP5 (46). After these initial contacts, rotavirus RRV interacts with at least three additional proteins located at the cell surface, integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha x\beta 2$ (19, 22), and the heat shock cognate protein hsc70 (20);

whether these last three interactions occur sequentially, or alternatively, has not been determined. The virus interaction with hsc70 is mediated by a domain in VP5 located between amino acids 642 and 659 of the protein, and this interaction takes place at a post-attachment step, since a synthetic peptide that mimics this region (peptide KID) and antibodies to hsc70 block the infectivity of rotavirus, but not its binding to the cell surface (20, 45).

Hsc70 is a constitutive member of the heat shock-induced hsp70 protein family. The proteins in this family are evolutionarily conserved, but they are not functionally interchangeable; the functional diversity of these molecular chaperones may result from variations in their ability to bind to different target proteins (15). The heat shock proteins have been associated with a number of functions, including protein folding, translocation across membranes, and assembly and disassembly of oligomeric complexes. In particular, hsc70 has been shown to favor the transport of proteins across organelle membranes, binding nascent polypeptides and dissociating clathrin from clathrin coats (3). Hsc70 contains two functional domains, an amino-terminal ATPase domain (AD, 44 kDa, aa 1 to 383) that contains the nucleotide-binding site, and a carboxyl-terminal peptide-binding domain (PBD, 30 kDa, aa 384 to 650) that contains the substrate-binding pocket determining the specificity for different peptide substrates (16). The ATPase domain is well conserved among the members of the hsp70 family, while the peptide-binding domain is more variable (3, 30).

In this work we report that soluble, recombinant-expressed hsc70 interacts with rotavirus particles through its peptide-binding domain, and we show that this interaction reduces virus infectivity in an ATP-dependent manner, most probably by inducing a conformational change in the virus.

Materials and Methods

Cells and viruses. MA104 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. Rhesus rotavirus (RRV, G3P5[3]) was obtained from H.B. Greenberg, Stanford University; Stanford, CA, and was propagated in MA104 cells as previously described (34). The viral particles were purified by CsCl density centrifugation of a virus lysate pre-incubated with 10 µg/ml of trypsin (Gibco, specific activity 1 unit/250 mg) for 60 min at 37°C, and treated as described previously (47).

Proteins and peptides. A cDNA clone of human hsc70 (GenBank Accession No. M11717, in plasmid pETHSC) was originally obtained from R. T. Morimoto, Northwestern University, Evanston, IL. The sequences encoding the complete hsc70 protein, as well as its amino- (ATPase domain, AD, aa 1 to 383) and carboxy- (peptide-binding domain, PBD, aa 384 to 650) terminal domains were subcloned into the pET28 expression vector (Novagene) to generate fusion proteins with a six-histidine tail at their carboxy termini. The hsc70 mutant K71M (32) was made using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Promega) and the sense oligonucleotide 5'-₁₉₃CCACACAGTTTTT**GATGCCATGCGTCTGATTGGTCGACG**₂₃₂-3' (the mutated nucleotides are shown in bold). The recombinant proteins produced in bacteria were purified by affinity chromatography on HiTrap chelating columns (Pharmacia). The nucleotide associated to the purified recombinant proteins was most probably ATP, given the high ATP/ADP ratio present in normal cells, and the higher affinity of hsc70 for ATP (4). To obtain nucleotide-free hsc70, the purified protein was incubated with 10 mM EDTA

for 10 min at room temperature, and then was precipitated by addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 75% saturation. The protein was redissolved in PBS, dialyzed to eliminate the excess of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and stored at 4°C, where it is stable for several months (4). The nucleotide-free hsc70 was loaded with different nucleotides as described below. Synthetic peptide A ($^{103}\text{FYQLALT}^{109}$) derived from a peptide of protein p53 containing (15), and peptide C ($^{491}\text{KLIGVLSSLFRPC}^{502}$) derived from the surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus (48), and an irrelevant peptide control derived from RRV rotavirus VP5 protein ($^{676}\text{INNDEVFEAGTDGRY}^{690}$), were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA), and used at the indicated concentrations.

Luciferase refolding assay. Luciferase (0.5 mg/ml, Sigma) was denatured by incubation in buffer B (6 M guanidinium chloride, 5 mM DTT, 50 mM KCH_3COO , 25 mM Hepes, pH 7.2) for 60 min at room temperature. The denatured samples were then diluted 40-fold with buffer C (50 mM KCH_3COO , 5 mM DTT, 1 mg/ml bovine serum albumin [BSA], 25 mM Hepes, pH 7.2). For the renaturation step, the samples were further diluted 25-fold with buffer D (120 mM KCH_3COO , 1.2 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mg/ml BSA, 28 mM Hepes, pH 7.5) with or without the chaperones hsc70 (0.5 μM) and hsp40 (Sigma) (0.025 μM). The mixture was incubated for 90 min at 37°C, and then 1 μl of the reaction mixture was withdrawn and mixed with 50 μl of luciferase substrate (Roche), and the light produced was detected in a scintillation counter (Beckman). An equal amount of non-denatured luciferase in buffer C was measured, and its activity taken as 100% (5, 41).

Infectivity assays. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM, and 50 µl of different concentrations of peptide diluted in MEM were added to the cells for 30 min at 37°C. After this incubation period, the peptide solution was removed and rotavirus RRV (2,000 focus-forming units/well) was then added and adsorbed to the cells surface for 1 h at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed twice with MEM, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. The infected cells were fixed and immunostained as previously described (1). Around 200 focus-forming units were counted in each well with the aid of a Visiolab 1000 station (21).

Hsc70 binding assay. 96-well ELISA plates (Costar) were coated with a polyclonal goat anti-rotavirus hyperimmune serum (diluted 1:10,000) that was used as capture antibody. To avoid nonspecific binding, the plates were then incubated with a solution of 1% BSA in PBS for 2 h at 37°C. Then, 200 ng of purified rotavirus triple-layered particles (TLPs) were added per well and incubated for 1 h at 37°C. The plates were washed twice, and incubated with the indicated concentration of recombinant proteins for 1 h at 37°C. The recombinant hsc70 proteins bound to the viral particles was detected with a rabbit anti-hsc70 hyperimmune serum (diluted 1:2,000) (20), followed by a mouse anti-rabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase (diluted 1:1,500) and the substrate Sigma 104 (1 mg/ml) diluted in diethanolamine buffer (100 mM diethanolamine [pH 9.4], 1 mM MgCl₂, 5 mM sodium azide). The absorbance at 405 nm was recorded in a Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek Instruments). The recombinant proteins eluted from the HiTrap column were employed in this assay without further treatment. As controls the absorbance obtained in

wells having all components of the assay but virus, or having virus but lacking hsc70, were used.

Permeabilization assay. Confluent monolayers of MA104 cells in 96-well plates were infected with trypsin-activated RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 8, in the presence of 2 mg/ml of peptide C and 150 μ g/ml of α -sarcin (Sigma), for 1 h at 37°C. After this time the virus inoculum was removed, and fresh serum-free MEM, supplemented with 25 μ Ci of 35 S-protein labeling mix EXPRE 35 S 35 S (>1000 Ci/mmol) per ml was added, and the cells were further incubated for 1 h at 37°C. After the labeling period, the cells were washed with PBS, treated with 5% trichloroacetic acid 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 samples was determined by liquid scintillation counting after solubilization of the samples in Ecolite (ICN) (7).

Hsc70-TLPs interaction in solution. 1.6 μ g of nucleotide-free hsc70 was incubated with 1 mM of ATP, ADP or ATP γ S for 15 min at room temperature, and then with 1.2 μ g of virus in 50 μ l of PBS, or in refolding conditions with 0.025 μ M of hsp40 (Sigma), for 90 min at 37°C. After incubation, the samples were pelleted through a sucrose cushion (40% sucrose in PBS containing 0.01% BSA) by centrifugation for 40 min at 4°C in an Airfuge (Beckman), at 25-psi (133,000 x g). The resultant pellet was dissolved in PBS and the infectivity of the viral particles recovered in the pellet, as well as their protein composition, were determined by immunoblot and infectivity assays.

Effect of pH and temperature on virus infectivity. TLPs incubated with hsc70 and centrifuged through a sucrose cushion, as described above, were incubated in a PBS solution adjusted to the indicated pH with either HCl or NaOH (pH 2, 2.5, 3, 3.5, 4 – 8, 8.5, 9, 9.5) for 1h at 37°C, and the virus samples were then diluted 10-folded in MEM without serum (13). To evaluate the effect of temperature on virus infectivity, the hsc70-treated TLPs were incubated for 20 min at 37, 40, 45, or 50°C in PBS. After the pH or temperature treatments, the viruses were adsorbed to confluent monolayers of MA104 cells on 96-well plates for 1 h at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed twice with MEM, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C, and the infected cells were detected by immunocytochemistry as described above. As control, we used TLPs that were treated as above, except that the incubation buffer lacked hsc70.

Immunoblots. The proteins recovered in the pellets after centrifugation of the TLP-hsc70 mixture through a sucrose cushion (see above) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and then transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in PBS, and incubated at 4°C with a mixture of rabbit anti-rotavirus and anti-hsc70 sera, diluted in PBS/0.01% milk, followed by incubation with a horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit antibody. The peroxidase activity was developed by the Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences), following the manufacturer's instructions.

Antibody ELISA. 96-well ELISA plates (Costar) were coated with a goat anti-rotavirus serum and blocked with BSA as described above. Then, 200 ng per well of rotavirus TLPs, pre-incubated or not with hsc70, and centrifuged through a sucrose cushion, were added to each well and incubated for 1 h at 37°C. The plates were washed twice, and the bound virus was detected using a panel of antibodies: Rabbit polyclonal antibodies to rotavirus (α TLPs, 1:4,000) and to the carboxyl-terminal region of VP5 (474, 1:4,000), and monoclonal antibodies (MAbs) to VP8 (MAb 7A12, 1:800), VP5 (MAbs HS2, 1:100 and 2G4, 1:800) and VP7 (MAbs 159, 1:400; 4F8, 1:800 and 60, 1:100). The bound primary antibodies were detected by addition of the corresponding alkaline phosphatase-conjugated antibody and substrate, and the absorbance at 405 nm was recorded in a Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek Instruments). The difference in reactivity obtained with the antibodies was evaluated using a two tailed, paired t-test.

Results

Hsc70 binds to rotavirus through its peptide-binding domain. We have previously shown that rotavirus triple-layered particles (TLPs), but not double-layered particles (DLPs), bind to purified hsc70 by ELISA (20). Hsc70 has two functional domains, an amino-terminal ATPase (A) domain that comprises amino acid residues 1 to 383, and a carboxyl-terminal peptide-binding (PB) domain represented by amino acids 384 to 650 (Fig. 1A). To determine which of these two domains of hsc70 is involved in binding the virus, the complete hsc70 protein and its A and PB domains were expressed in *E. coli* as fusions to histidine tails, and the resultant proteins were purified by NTA-affinity chromatography, and analyzed by gel electrophoresis (Fig. 1B). ELISA plates coated with RRV TLPs were then incubated with increasing concentrations of the recombinant proteins, and the protein bound to TLPs was detected using a rabbit polyclonal serum to hsc70. The complete hsc70 protein and its PB domain were found to bind TLPs in a concentration dependent manner, while the A domain did not bind TLPs at any of the concentrations tested (Fig. 2A). As previously shown for hsc70 (20), pre-incubation of the recombinant PB domain of hsc70 with the virus reduced virus infectivity by about 40%; in contrast, the A domain of hsc70 had no effect (results not shown).

We have previously established that rotavirus particles interact with hsc70 through a region near the carboxyl-terminal region of VP5 (45). To determine whether the interaction of TLPs with the PB domain of hsc70 was through the same region of VP5, the amino-terminal portion of VP5 (VP5-248, residues 274 to 474) or the carboxyl-terminal part of this protein (VP5-474, amino acids 474 to 776) were expressed in bacteria and purified by affinity chromatography (45). These recombinant polypeptides were preincubated either with the complete hsc70 protein or its PB domain, and these mixtures were then added to

ELISA plates coated with TLPs. We found that protein VP5-474, but not VP5-248, was able to compete the binding of both hsc70 and its PB domain to TLPs (Fig. 2B). Also, the VP5-474 and VP5-248 proteins were used to coat ELISA plates, and were tested for their ability to bind the complete hsc70, or its two independent domains. Hsc70 and its PB domain bound to the carboxyl-terminal part of VP5 in a concentration dependent manner, but not to the amino-terminal region of VP5 (results not shown). Altogether, these results suggest that viral particles bind to the PB domain of hsc70.

Known ligands of hsc70 compete the interaction of TLPs with hsc70. *In vitro* studies have shown that hsc70 binds to carboxymethylated lactalbumin (CMLA), the denatured and reduced form of lactalbumin (LA), while it does not recognize the native protein (33). Hsc70 also binds short synthetic peptides with hydrophobic internal residues, enriched particularly in Leu, but also in Ile, Val, Phe, and Tyr, and flanking regions in basic residues (36, 37, 40), like peptide C, derived from the surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus (48), and peptide A, derived from a peptide of protein p53 (15). To establish if hsc70 binds TLPs through its peptide-binding domain, the ability of CMLA and peptide C to compete this interaction was tested. In these assays, proteins hsc70 or PB were preincubated with different amounts of peptide C, or proteins LA and CMLA, and then added to ELISA plates that had been previously coated with TLPs. Increasing concentrations of peptide C and CMLA decreased the amount of recombinant proteins bound to TLPs, while LA did not affect this interaction (Figs. 3A and 3B). These results suggest that hsc70 interacts with the viral particles through its peptide-binding domain, used by this chaperone to bind other ligands.

Ligands of hsc70 block rotavirus infectivity. Hsc70 has been detected on the surface of MA104 cells, and it has been shown that this protein is involved in rotavirus cell infection at a post-attachment step (20). To evaluate if the interaction of the virus with hsc70 on the cell surface was similarly affected by known ligands of the chaperone, the effect of peptides A and C on the infectivity of the virus was tested. Pre-incubation of MA104 cells with these peptides prior to the addition of the virus resulted in an inhibition of infectivity of about 70%, while an irrelevant peptide did not block rotavirus infection (Fig. 4). To discard a nonspecific inhibitory effect of the peptides on the cell that would prevent rotavirus replication, the peptides were added after the virus had been allowed to enter the cells for 1 h at 37°C; under these conditions none of the peptides had an effect on the infectivity of the virus (results not shown). Altogether, these results suggest that during cell infection the virus particle interacts with the peptide-binding domain of hsc70, interaction that is important for the entry process of the virus into the cell.

The interaction between hsc70 and rotavirus does not prevent the coentry of α -sarcin. It has been shown for several viruses, including rotaviruses, that the entry of viral particles into the cell induces an early permeabilization of the cell membrane (7, 14, 28). The early cell permeabilization induced by rotavirus allows the co-entry of the toxin α -sarcin, a potent inhibitor of the cell translation machinery, whose activity in the cytosol results in a severe arrest of protein synthesis (10, 38). To determine if peptide C blocks the infectivity of rotavirus by interfering its entry into the cell, an α -sarcin co-entry assay was carried out. When α -sarcin was added to the cells either alone or in the presence of peptide C, but in the absence of virus, no effect on protein synthesis was observed, as measured by

the incorporation of ³⁵S-labeled amino acids into protein (Fig 5). However, when the toxin was added in the presence of virus, a drastic reduction in protein synthesis of 75-80%, as compared to uninfected cells, was observed. The same level of inhibition of protein synthesis was observed when the virus was added in the presence of peptide C (Fig. 5), indicating that this peptide did not affect the co-entry of α -sarcin, although under these conditions (an MOI of 8, and 2 mg/ml peptide C) peptide C blocks virus infectivity by 70% (see Fig. 4). Similarly, incubation of the cell with antibodies to hsc70 does not block the co-entry of α -sarcin, despite of inhibiting virus infectivity by 50% (results not shown). These data suggest that peptide C interferes the interaction of the virus with hsc70, blocking virus infection at a step that takes place after the early permeabilization of the cell membrane.

A transient interaction of hsc70 with the viral particle modifies permanently its infectivity. The chaperone activity of hsc70 depends on the hydrolysis of ATP, and is enhanced by the presence of the co-chaperone hsp40. To test if the purified recombinant hsc70 used in these assays was active, an *in vitro* hsc70-dependent luciferase-refolding assay was performed. For this, native firefly luciferase was denatured with guanidinium hydrochloride and then incubated with hsc70 in the presence of hsp40 and ATP; the activity of the refolded luciferase was then measured and compared with those of the native and denatured proteins. Forty percent of the denatured luciferase activity was recovered after refolding the protein in the presence of hsc70, hsp40, and ATP (Fig. 6A), a level of activity similar to that recovered in previously reported hsc70 refolding assays (5, 41).

We have previously shown that incubation of hsc70 with virus particles decreases the infectivity of the virus by about 50% (20). To determine if this hsc70-induced reduction

in virus infectivity requires the chaperone activity of the protein, an assay in solution was setup. In this assay, performed in which purified TLPs were incubated with hsc70 either in the absence or the presence of hsp40, for 90 min at 37⁰C, and the viral particles were then pelleted through a 40% sucrose cushion to remove the soluble proteins. The virus particles recovered in the pellet were analyzed by Western blot using antibodies to the viral structural proteins and to hsc70, and the infectivity of the virus particles present in the pellet was also determined. The immunoblots showed that the stoichiometry of the structural proteins present in the viral particles incubated with hsc70 in the presence or absence of hsp40 was similar to that of control TLPs incubated in the absence of the chaperone (Fig. 6B), i.e., there were no detectable losses of any particular viral proteins, including surface proteins VP5 and VP7. VP8 was not detected in the immunoblots, but the fact that MAb 7A12, directed to VP8, recognized TLPs treated or not with hsc70 suggests that this VP4 subunit was not lost from the virion (see below). On the other hand, hsc70 was not detected in the pellet of any of the experimental conditions tested, indicating that the interaction of this protein with TLPs was either transient or weak, remaining in the soluble fraction at the top of the sucrose cushion upon centrifugation of the samples. When the infectivity of the viral particles recovered in the pellet was determined, a reduction of about 50% in the infectivity of the virus pre-incubated with hsc70 was observed, as compared to that of TLPs pre-incubated in the absence of the chaperone (Fig. 6C). The infectivity of the virus was found to be further reduced (about 70%) when the virus was pre-incubated in the presence of both hsc70 and its co-chaperone hsp40 (Fig. 6C). The fact that the virus particles pre-incubated with hsc70, and centrifuged through a sucrose cushion, showed a decreased infectivity even in the absence of detectable hsc70, suggests

that under the conditions employed the interaction of hsc70 with the virus particles might cause a conformational change in the virus that results in a reduced infectivity.

The reduction of rotavirus infectivity induced by hsc70 is dependent on the hydrolysis of ATP. The chaperone activity of hsc70 requires the hydrolysis of ATP. To evaluate whether this activity is required for the reduction of virus infectivity, purified hsc70 was depleted from the associated nucleotide by incubation with EDTA, and the nucleotide-free protein was incubated with TLPs in the presence of either ATP, ADP, or ATP γ S, a non-hydrolysable analogue of ATP. After the incubation period, the viruses were centrifuged through a sucrose cushion, and the infectivity of the TLPs in the pellet was determined. In the presence of ATP, hsc70 induced a 50% reduction in the infectivity of the virus, while a reduction of about 30% was observed in the presence of ADP (Fig 7B). The infectivity of TLPs incubated with hsc70-ATP γ S was not affected, being equivalent to that observed in control TLPs, incubated in the absence of the chaperone (Fig. 7B). Of interest, when the virus particles recovered in the pellet were analyzed by immunoblot, hsc70 was found in this fraction when the TLPs were incubated with hsc70-ADP, suggesting that under these conditions the chaperone remained associated to the virus (Fig.7A). This was not the case when TLPs were incubated with hsc70 in the presence of either ATP or ATP γ S. These results suggest that the transient interaction of hsc70 with the virus that leads to inactivation of its infectivity requires the hydrolysis of ATP, while hsc70-ADP is able to block the infectivity of the virus through a more stable interaction with TLPs, probably causing an steric interference during virus infection.

To further confirm the relevance of the ATPase activity of hsc70 for the inactivation of the virus, we constructed and expressed in bacteria a mutant hsc70 protein (mutant K71M) with a single amino acid change in the A domain (see Fig. 1A), which has been previously shown to abolish the ATPase activity of the chaperone (32). As expected, the recombinant K71M protein was not able to restore the activity of denatured luciferase in the luciferase-refolding assay (Fig. 6A). However, it bound TLPs in a concentration dependent manner by ELISA, and this binding was competed by incubation with CMLA indicating that the mutant recombinant protein was still able to interact with TLPs through its peptide-binding domain (results not shown). When TLPs were incubated with hsc70-K71M in the presence of ATP and hsp40, and then centrifuged through a sucrose cushion as described before, the infectivity of the virus recovered from the pellet was not decreased, as compared to control TLPs (Fig. 6C). These results confirm that the ATPase activity of hsc70 is required to inactivate the infectivity of the virus.

Hsc70 induces a conformational change in rotavirus particles. To determine if the interaction of hsc70 with TLPs induces a conformational change in the virus, the reactivity of hsc70-treated TLPs with antibodies directed to the virus surface proteins, was characterized by ELISA. In these assays the plates were coated with a goat anti-rotavirus antibody, and then TLPs that had been pre-incubated or not with hsc70, and pelleted through a sucrose cushion, were added. The reactivity of three monoclonal antibodies (MAbs) that recognize different epitopes of VP7 (159, 4F8, and 60), two MAbs against different epitopes in VP5 (HS2 and 2G4), one MAb directed to VP8 (7A12), and a polyclonal antibody (474) that recognizes the carboxyl-terminal region of VP5 (aa residues 474-776) were determined. A polyclonal anti-rotavirus antibody was used to normalize the

amount of input virus used in the assay. We found that antibodies 474 to VP5, and 60 to VP7, showed a higher and lower reactivity, respectively, with TLPs incubated with hsc70, as compared to viral particles not incubated with the chaperone (Fig. 8A). Although the difference in reactivity obtained with these antibodies was not very pronounced, it was very reproducible and statistically significant ($p < 0.05$).

To evaluate by a different criteria if the hsc70-treated virus could be distinguished structurally from the untreated TLPs, we tested the effect of pH and temperature on their infectivity. As can be seen in figure 8B, the infectivity of hsc70-treated virus was more sensitive to heat than that of the untreated control virus, being significantly different after incubation for 20 min at 50⁰C ($P < 0.01$). Likewise, after incubation of TLPs with hsc70 the virus particles became more sensitive to basic pH than control TLPs, showing a decreased stability of infectivity at pH in the range of 8 to 9.5 ($p < 0.05$) (Fig. 8C). Altogether, these results suggest that the interaction of hsc70 with TLPs induces a slight conformational change in the outer layer proteins of the virus that is sufficient, however, to reduce the virus infectivity.

Discussion

Hsc70, a constitutive member of the heat shock-induced hsp70 protein family, has been reported to be present on the surface of several cell types (20, 31), including MA104 cells, where it has been proposed to serve as a post-attachment receptor for rotavirus infection (20). The virus interacts with hsc70 through a domain in VP5 located between amino acid residues 642 and 658, near the carboxyl terminus of VP4 (29, 45). In this work, we have shown that hsc70 interacts specifically with rotavirus through its peptide-binding domain, since: i) A recombinant full length hsc70 protein and its peptide-binding domain, but not its ATPase domain, bound TLPs in a solid-phase assay; ii) this binding was competed by pre-incubation of the protein with the carboxyl-terminal region of VP5 (which contains the VP5 domain known to interact with hsc70), but not with its amino-terminal portion; and iii) known ligands of hsc70 compete the binding of this protein to TLPs in the solid-phase assay. The peptide ligands of hsc70 were also shown to block rotavirus infectivity when added to the cell before virus infection, suggesting that hsc70 on the surface of MA104 cells also interacts with the virus through its peptide-binding domain.

The interaction of hsc70 with the virus during cell entry has been shown to occur at a post-attachment level during virus cell infection, since either pre-incubation of cells with antibodies to hsc70 or pre-incubation of the virus with the chaperone, block virus infection but not the binding of the virus to the cell surface (20). Furthermore, the early permeabilization of the cell membrane induced during the entry of rotavirus into MA104 cells has been shown to allow the co-entry of α -sarcin into the cells, thus inhibiting the synthesis of proteins (7, 28). Of interest, the co-entry of the toxin was not prevented by pre-incubation of the cells with peptide C, or with antibodies to hsc70 (results not shown). These results indicate that either the interaction of hsc70 with the virus occurs at a step

during virus entry subsequent to permeabilization of the plasma cell membrane, or the remaining 30% infectivity of the virus that still occurs in the presence of peptide C is responsible for the toxic effect detected. The first explanation seems more likely, since the effect of α -sarcin has been shown to correlate with the multiplicity of infection used (results not shown, and ref. (7), and the 70% reduction in infectivity caused by peptide C should also have resulted in a less pronounced inhibition of protein synthesis by α -sarcin, as compared to the inhibition observed in the absence of peptide C.

Pre-incubation of the virus with hsc70 reduces its infectivity. This effect was shown to depend on the ATPase activity of the chaperone, since in the presence of a non-hydrolysable analogue of ATP hsc70 failed to inhibit viral infectivity. The observed reduction in infectivity was slightly more pronounced in the presence of the co-chaperone hsp40, that is known to enhance the chaperone function of hsc70, although it is not essential for its activity (8, 27, 42). Of interest, hsc70 also inhibited the infectivity of the virus in the presence of ADP, although to a lower extent. These apparently conflicting data could be the result of a differential interaction of hsc70 with the virus in the presence of either ATP or ADP, since it is known that the binding of hsc70 to its substrate is regulated by the type of nucleotide bound to the chaperone (39). Two substantially different conformations for peptide-free hsc70 exist in the presence of either ATP or ADP (43). When ATP is present there is a significant interaction between the carboxyl-terminal PB domain and the amino-terminal A domain of hsc70, such that the effect of peptide binding is transmitted to the ATPase domain, resulting in an increased rate of ATP hydrolysis and ADP + Pi release, and reciprocally, the ATPase domain constrains the peptide binding domain to a low-peptide affinity conformation (39). Hydrolysis of ATP stabilizes the

hsc70-protein complex, until ADP/ATP exchange allows the protein release, closing the catalytic cycle (4). In the presence of ADP, the PB domain is not as constrained by the A domain and could capture the peptide to form a high affinity complex (23, 39); ADP can be removed from the complex hsc70-ADP-sustrate only by ADP/ATP exchange.

Our results also indicate a differential interaction of hsc70 with rotavirus TLPs in the presence of either ATP or ADP, as judged by the stability of the hsc70-virus complex under different conditions. In the presence of ADP the chaperone protein was recovered from the pellet after centrifugation of the virus/hsc70 mixture through a sucrose cushion, suggesting that hsc70 was associated to the virus particles during the centrifugation step. On the other hand, the chaperone was not found in association with the virus upon centrifugation of a virus/hsc70 mixture incubated in the presence of ATP, suggesting that the interaction of hsc70-ATP with TLPs is of lower affinity than that of hsc70-ADP. The reduction in virus infectivity induced by incubation of hsc70 in the presence of either nucleotide might result from two different mechanisms of inhibition. In the presence of ADP the reduction in viral infectivity might be due to hsc70 blocking, by steric hindrance, the interaction of the virus with its receptors on the cell membrane. On the other hand, in the presence of ATP hsc70 might induce a conformational change in the viral particle that irreversibly inactivates the virus. The differential reactivity of antibodies with TLPs incubated or not with hsc70, as well as the differential susceptibility of the hsc70-treated and untreated viruses to heat and pH support this hypothesis. The relevance of a functional ATPase activity in hsc70 to reduce virus infectivity was further shown by the fact that a mutant hsc70 protein lacking ATPase activity failed to decrease virus infectivity. In light of these results, it is tempting to hypothesize that during cell infection the interaction of the virus with hsc70 on the surface of MA104 cells results in a conformational change of the

virus particle that facilitates, or is required for, virus entry. However, when this interaction takes place with soluble hsc70 in the absence of cells, it triggers a change that inactivates the virion. A similar observation has been reported for other viruses, like human immunodeficiency virus (24, 44), avian leucosis and sarcoma viruses (9, 18), and poliovirus (2, 35). In the case of poliovirus, upon interaction of the virion with the poliovirus receptor (in solution, the virus suffers a conformational rearrangement in which VP4 is released from the virion, changing their density and rendering non-infectious virus particles (2, 35). Altogether, these results suggest that hsc70 might have an active role in rotavirus cell infection, serving not only as an anchor for the viruses on the cell membrane during their transit to the cell's cytoplasm, but helping the virus to enter the cell by possible modifying the conformation of its surface proteins, what might be required for the virus to enter the cell.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants 55003662 and 55000613 from the Howard Hughes Medical Institute, and G37621N from Conacyt Mexico. JPV was supported by a scholarship (No. 128410) granted by CONACYT.

References

1. **Arias, C. F., M. Lizano, and S. Lopez.** 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**:633-642.
2. **Belnap, D. M., D. J. Filman, B. L. Trus, N. Cheng, F. P. Booy, J. F. Conway, S. Curry, C. N. Hiremath, S. K. Tsang, A. C. Steven, and J. M. Hogle.** 2000. Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J. Virol.* **74**:1342-1354.
3. **Bukau, B., and A. L. Horwich.** 1998. The hsp70 and hsp60 chaperone machine. *Cell* **92**:351-366.
4. **Buxbaum, E., and P. Woodman.** 1996. Binding of ATP and ATP analogues to the uncoating ATPase hsc70 (70 kDa heat shock cognate protein). *J. Biochem.* **318**:923-929.
5. **Chang, T. C., C. D. Hsiao, S. J. Wu, and C. Wang.** 2001. The effect of mutating arginine-469 on the substrate binding and refolding activities of 70-kDa heat shock cognate protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **386**:30-36.
6. **Ciarlet, M., S. E. Crawford, E. Cheng, S. E. Blutt, D. A. Rice, J. M. Bergelson, and M. K. Estes.** 2002. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J. Virol.* **76**:1109-1123.
7. **Cuadras, M., C. Arias, and S. López.** 1997. Rotavirus induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* **71**:9065-9074.

8. **Cyr, D. M., T. Langer, and M. G. Douglas.** 1994. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**:176-181.
9. **Damico, R., and P. Bates.** 2000. Soluble receptor-induced retroviral infection of receptor-deficient cells. *J. Virol.* **74**:6469-6475.
10. **Endo, Y., and I. G. Wool.** 1982. The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosome. *J. Biol. Chem.* **257**:9054-9060.
11. **Estes, M. K.** 2001. Rotavirus and their replication., p. 1747-1785. *In* P. M. H. *In* D. N. Knipe, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman and S.E, Strass (ed.), *Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
12. **Estes, M. K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**:410-419.
13. **Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, and C. P. Gerba.** 1979. Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen. Virol.* **43**:403-409.
14. **Fernandez-Puentes, C., and L. Carrasco.** 1980. Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* **20**:769-775.
15. **Fourie, A., J. Sambrook, and M.-J. Gething.** 1994. Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **269**:30470-30478.
16. **Frydman, J.** 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:603-647.
17. **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.

18. **Gilbert, J. M., L. D. Hernandez, J. W. Balliet, P. Bates, and J. M. White.** 1995. Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* **69**:7410-7415.
19. **Graham, K., P. Halasz, Y. Tan, M. Hewish, Y. Takada, E. Mackow, M. Robinson, and B. Coulson.** 2003. Integrin-using rotavirus bind $\alpha 2\beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha X\beta 2$ and $\alpha V\beta 3$ by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* **77**:9969-9978.
20. **Guerrero, C. A., D. Bouyssounade, S. Zarate, P. Isa, T. Lopez, R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, S. Lopez, and C. F. Arias.** 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* **76**:4096-4102.
21. **Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias.** 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362-9371.
22. **Guerrero, C. A., S. Zarate, P. Isa, E. Mendez, S. Lopez, and C. Arias.** 2000. Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14644-14649.
23. **Ha, J. H., and D. McKay.** 1995. Kinetics of nucleotide-induced changes in the tryptophan fluorescence of the molecular chaperone hsc70 and its subfragments suggest the ATP-induced conformational change follows initial ATP binding. *Biochemistry.* **34**:11635-11644.
24. **Jones, P. L., T. Korte, and R. Blumenthal.** 1998. Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J. Biol. Chem.* **273**:404-409.

25. **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.
26. **Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, and R. M. Chanock.** 2001. Rotavirus, p. 1787-1833. *In I. D. N. K. a. P. M. Howley (ed.), Virology*, vol. 2. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia.
27. **Kelley, W. L.** 1998. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* **23**:222-227.
28. **Liprandi, F., Z. Moros, M. Gerder, J. E. Ludert, F. H. Pujol, M. C. Ruiz, F. Michelangeli, A. Charpilienne, and J. Cohen.** 1997. Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor alpha-sarcin. *Virology* **237**:430-438.
29. **Lopez, S., and C. F. Arias.** 2004. Rotavirus entry into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**:251-300.
30. **Lopez-Buesa, P., C. Pfund , and E. Craig.** 1998. The biochemical properties of the ATPase activity of a 70-kDa heat shock protein (hsp70) are governed by the C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15253-15258.
31. **Multhoff, G., and L. E. Hightower.** 1996. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Strees Chaperone* **1**:167-172.
32. **O'Brien, M., K. Flaherty, and D. McKay.** 1996. Lysine 71 of the chaperone protein hsc70 is essential for ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **271**:15874-15878.
33. **Palleros, D. R., W. J. Welch, and A. L. Fink.** 1991. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5719-5723.

34. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190-200.
35. **Racaniello, V. R.** 1996. The poliovirus receptor: a hook, or an unzipper? *Structure* **4**:769-773.
36. **Rudiger, S., A. Buchberger, and B. Bukau.** 1997. Interaction of hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* **4**:342-349.
37. **Rudiger, S., L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, and B. Bukau.** 1997. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**:1501-1507.
38. **Sperti, S., M. Zamboni, M. Brigotti, F. Rambelli, and L. Montanaro.** 1989. Alpha-sarcin impairs the N-glycosidase activity of ricin on ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**:857-861.
39. **Takeda, S., and D. McKay.** 1996. Kinetics of peptide binding to the bovine 70 kDa heat shock cognate protein, a molecular chaperone. *Biochemistry.* **35**:4636-4644.
40. **Takenaka, I., S. Leung, S. J. McAndrew, J. P. Brown, and L. E. Hightower.** 1995. Hsc70-binding peptides selected from a phage display peptide library that resemble organellar targeting sequences. *J. Biol. Chem.* **270**:19839-19844.
41. **Terada, K., M. Kanazawa, B. Bukau, and M. Mori.** 1997. The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. *J. Cell Biol.* **139**:1089-1095.
42. **Walsh, P., D. Bursac, Y. C. Law, D. Cyr, and T. Lithgow.** 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* **5**:567-571.

43. **Wilbanks, S. W., and D. McKay.** 1993. How potassium affects the activity of the molecular chaperone hsc70. *J. Biol. Chem.* **270**:2251-2257.
44. **Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardin, J. Robinson, and J. Sodroski.** 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J. Virol.* **69**:5723-5733.
45. **Zarate, S., M. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. Juárez, M. Camacho-Núñez, C. Arias, and S. López.** 2003. Interaction of rotavirus with hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* **77**:7254-7260.
46. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, C. A. Guerrero, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2000b. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* **278**:500 -504.
47. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* **74**:593-599.
48. **Zhang, J., and G. Walker.** 1996. Identification of elements of the peptide binding site of DnaK by peptide cross-linking. *J. Biol. Chem.* **271**:19668-19674.

Figure Legends

Fig. 1. Synthesis of the peptide-binding and ATPase domains of hsc70 in bacteria.

A) Schematic representation of the two domains of hsc70 protein. The amino-terminal ATPase domain (AD) is represented by a gray box, while the carboxyl-terminal peptide-binding domain (PBD) is shown as a dark-gray box. The thick lines represent the two domains expressed independently in *E. coli*. The amino acid change in the hsc70 mutant K71M is also shown. B) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified recombinant hsc70, AD, PBD, and K71M proteins, stained with Coomassie blue.

Fig. 2. The binding domain of hsc70 interacts with rotavirus TLPs.

A) ELISA 96-well plates coated with purified RRV TLPs (200 ng/well) were incubated with the indicated concentration of affinity-purified recombinant human hsc70, or its ATPase (AD) or peptide-binding (PBD) domains for 60 min at 37°C, and the recombinant protein bound was detected by incubation with a rabbit hyperimmune serum to hsc70 as described in Materials and Methods. The concentration of recombinant protein present in each well is plotted against the OD₄₀₅ reading obtained in the ELISA plate. B) The indicated concentration of affinity-purified recombinant VP5-248 or VP5-474 proteins were pre-incubated with 500 ng of hsc70 or PBD proteins for 30 min at 37°C. After incubation the mixtures were added to ELISA plates coated with purified RRV TLPs (200 ng/well), and bound hsc70 or PBD were detected as describe above. Data are expressed as the percentage of hsc70 or PBD protein bound to TLPs when these proteins were incubated with PBS as control. The arithmetic means and standard deviations of three independent experiments performed in duplicate are shown.

Fig. 3. Ligands of hsc70 compete the interaction rotavirus-hsc70. The indicated concentrations of peptide C (A), or carboxymethyl α -lactalbumin (CMLA) and lactalbumin (LA) (B), were pre-incubated with 500 ng of hsc70 or PBD recombinant proteins for 30 min at 37°C. After incubation, the mixtures were added to ELISA plates coated with purified RRV TLPs (200 ng/well), and the recombinant protein bound to TLPs was detected by incubation with a rabbit hyperimmune serum to hsc70 as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of hsc70 or PBD protein bound to TLPs when the protein was incubated with PBS as control. The arithmetic means and standard deviations of three independent experiments performed in duplicate are shown.

Fig. 4. Effect of hsc70 ligands on the infectivity of rotavirus RRV. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were incubated with the indicated concentrations of peptide A, peptide C, or a control peptide, for 30 min at 37°C, and then trypsin-activated RRV (2,000 ffu's per well) was added, and adsorbed for 1 h at 37°C. The excess virus was removed and the infection was allowed to proceed for 14 h at 37°C. Finally, the cells were fixed, immunostained, and the infectious foci counted as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of virus infectivity obtained when the cells were pre-incubated with PBS as a control. The arithmetic means and standard deviations for three independent experiments performed in duplicate are shown.

Fig. 5. The co-entry of α -sarcin is not blocked by peptide C. MA104 cells in 96-well plates were infected with trypsin-activated RRV at an MOI of 8, in the presence or absence

of 2 mg/ml of peptide C, and in the presence or absence of 150 µg/ml of α-sarcin, as indicated. Cells were then labeled with an [³⁵S]-protein labeling mix for 1 h at 37°C, and the radioactivity in the trichloroacetic acid-precipitable material was determined as described under Material and Methods. Data are expressed as percentage of [³⁵S]-amino acids incorporated in mock-infected cells, in the absence of α-sarcin and peptide C. The arithmetic means and standard deviations for three independent experiments performed in duplicate are shown.

Fig. 6. The interaction of hsc70 with rotaviral particles decreases their infectivity.

A) The *in vitro* hsc70-dependent luciferase refolding assay carried out as described under Materials and Methods. The presence in the reaction mixture of 0.5 µM hsc70, 0.5 µM K71M, and 0.025 µM hsp40 is indicated. The activity of refolded luciferase was determined and compared with those of the native and denatured proteins. Data are expressed as percentage of the activity detected with native luciferase. The arithmetic mean and standard deviation of two independent experiments performed in duplicate are shown.

B) Purified and trypsin-activated RRV (1.2 µg) was incubated with 1.6 µg of either hsc70 or hsc70-K71M (not shown in the figure) recombinant proteins in refolding conditions (see Material and Methods) for 1 h at 37°C, in the absence or presence of 0.025 µM hsp40, and then pelleted through a 40% sucrose cushion. The virus recovered in the pellet was analyzed by immunoblot with a mixture of rabbit hyperimmune sera to purified rotavirus TLPs and hsc70. The last lane in the immunoblot shows the input amounts of RRV and hsc70 used in the assay, analyzed before the centrifugation step.

C) The infectivity of the virus recovered in the pellet [obtained as described in (B)] was determined by an

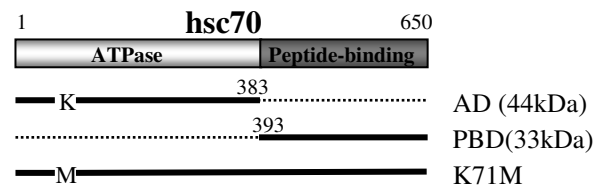
immunoperoxidase assay as described under Materials and Methods. The difference between the infectivity of untreated vs. virus treated with hsc70 alone was statistically significant (**, $P < 0.0001$), as it was also for the infectivity of the virus treated with hsc70 in the presence or absence of hsp40 (*, $P < 0.05$). Data are expressed as the percentage of virus infectivity obtained when the virus was incubated without hsc70 as control. The arithmetic mean and standard deviation for three independent experiments performed in duplicate are shown.

Fig. 7. Effect of different nucleotides on the interaction of hsc70 with the viral particles. Purified and trypsin-activated RRV (1.2 μg) was incubated with 1.6 μg of hsc70 for 1 h at 37°C in the presence of 1 mM of either ATP, ADP, or ATP γ S, and then pelleted through a 40% sucrose cushion. A dash indicates that no nucleotide was present in the reaction mixture. A) Immunoblot of the virus recovered in the pellet with a mixture of rabbit hyperimmune sera to purified rotavirus TLPs and hsc70. The first and last lanes of the immunoblot show the input amounts of virus and hsc70, respectively, used in these assays. B) The infectivity of the virus recovered in the pellet was determined by an immunoperoxidase assay as described under Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of virus infectivity obtained when the virus was incubated without hsc70 as control. The arithmetic mean and standard deviation of four independent experiments performed in duplicate are shown.

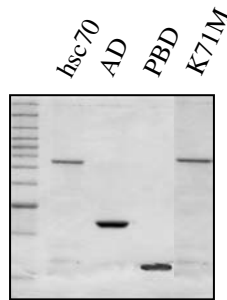
Fig. 8. Antibody reactivity, and effect of pH and temperature on the infectivity of virus treated with hsc70. (A) The virus recovered from the pellet, after centrifugation

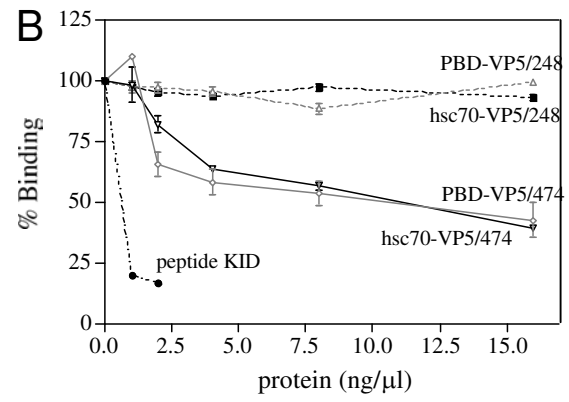
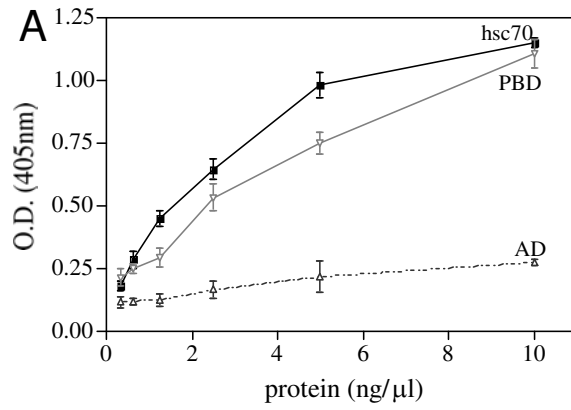
through a sucrose cushion, was added to a microtiter plate coated with goat hyperimmune serum to rotavirus and incubated for 1 h at 37°C. The indicated antibodies were then added, followed by the appropriate alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody. The phosphatase activity was detected as described in Material and Methods. A polyclonal anti-rotavirus antibody (α TLPs) was used to normalize the amount of input virus used in the assay. Data are expressed as percentage of reactivity of each antibody obtained when the virus was incubated without hsc70 as control. The arithmetic mean and standard deviation of six independent experiments performed in duplicate are shown. Statistically significant differences (paired t-test) in the reactivity of antibodies with hsc70-treated or untreated virus are indicated (* $P < 0.05$). (B) TLPs treated or not with hsc70 were incubated for 20 min at the indicated temperatures, and then adsorbed to cells for 1 h at 37°C. The infection was allowed to proceed for 14 h at 37°C, and the infectious foci were detected as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of virus infectivity obtained when the virus were pre-incubated at 37°C as a control. The arithmetic means and standard deviations for three independent experiments performed in duplicate are shown (** $P < 0.01$). (C) TLPs treated or not with hsc70 were incubated for 1 h at 37°C at the indicated pH, as described in Material and Methods. After a 10-fold dilution in MEM without serum, the viruses were adsorbed to cells for 1 h at 37°C. The infection was allowed to proceed for 14 h at 37°C, and the infectious foci were detected as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of virus infectivity obtained when the virus were pre-incubated at pH 7 as a control. The arithmetic means and standard deviations for four independent experiments performed in duplicate are shown (* $P < 0.05$).

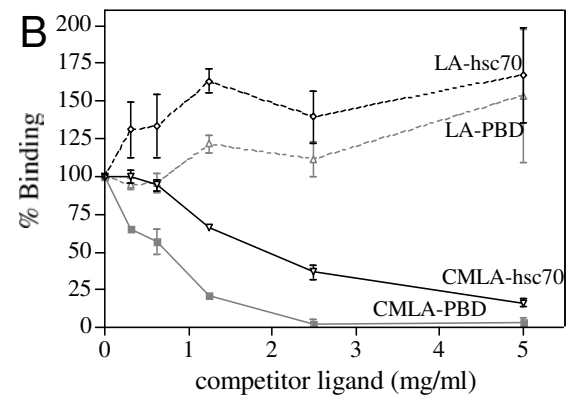
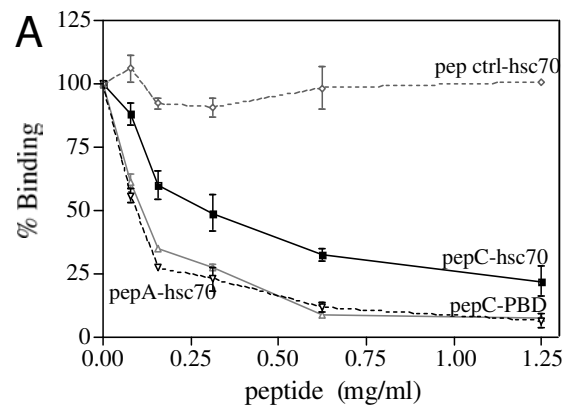
A

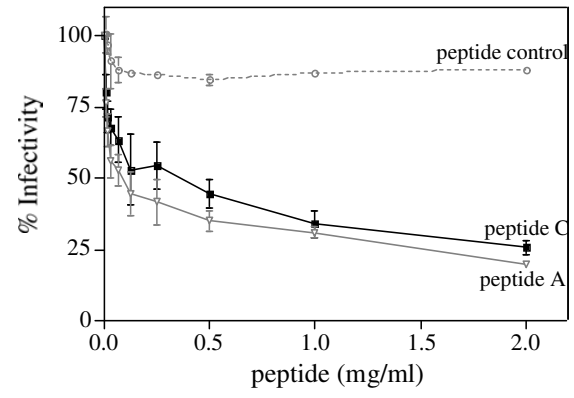


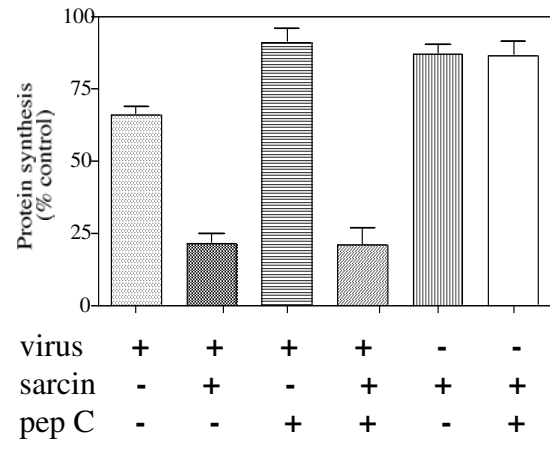
B

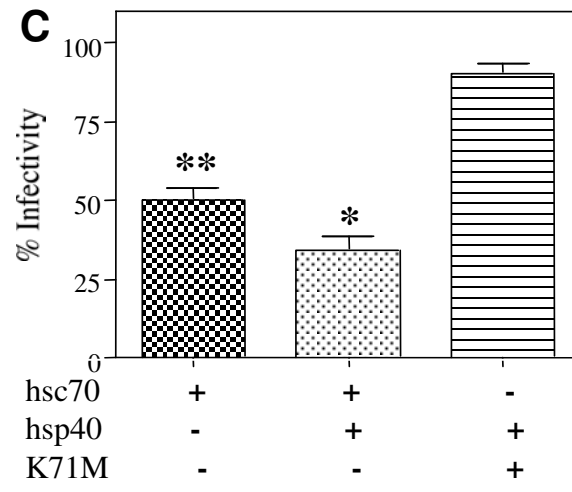
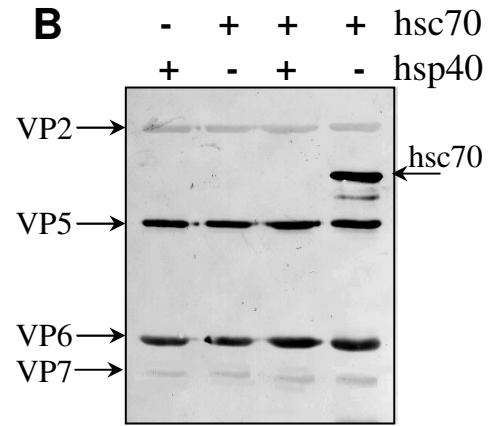
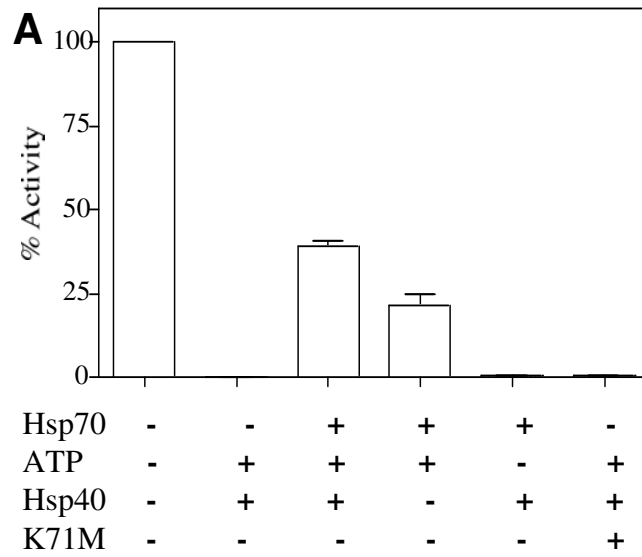


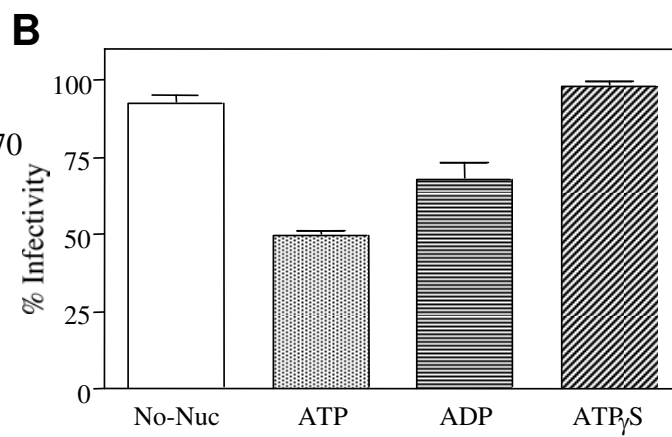
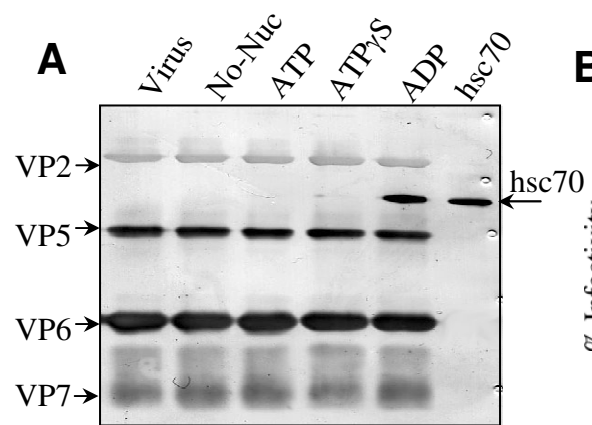


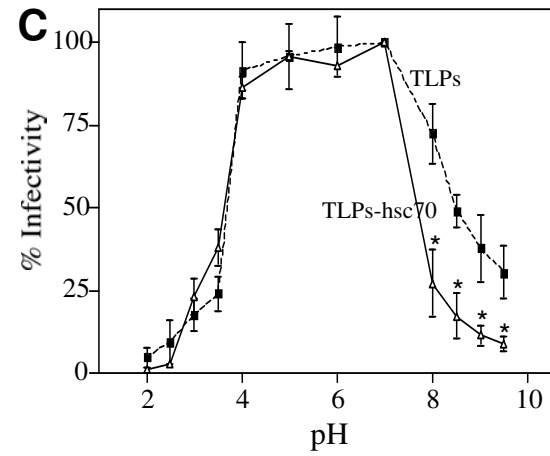
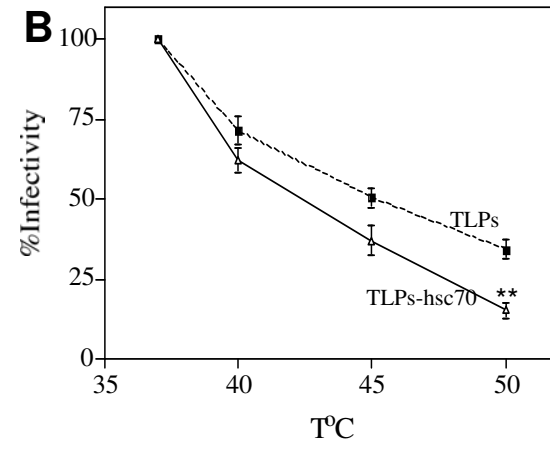
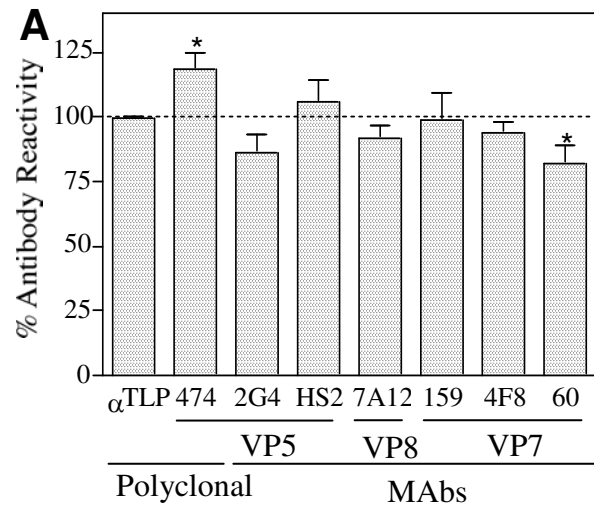












* Efecto del péptido C en la síntesis de proteínas

Los resultados de los ensayos de co-entrada de α -sarcina con el virus en presencia del péptido C, nos indicaron que la interacción del virus con hsc70 se da posterior a la permeabilización de la membrana. Para tratar de entender la interacción del virus con hsc70, quisimos evaluar qué pasaba con la síntesis de proteínas virales en presencia y ausencia del péptido C. Se incubó el virus con células previamente incubadas en la presencia o ausencia de péptido C durante 60 min. Después del período de adsorción del virus, las células se lavaron y se dejó seguir la infección por diferentes tiempos marcando 60 min con ^{35}S -Met antes de cosechar. Las muestras de los diferentes tiempos se analizaron por SDS-PAGE. Encontramos que la síntesis de proteínas virales disminuye cuando la infección se hace en presencia del péptido C (Fig. 8.2). Esto muestra claramente que el péptido C bloquea eficientemente la infección del virus.

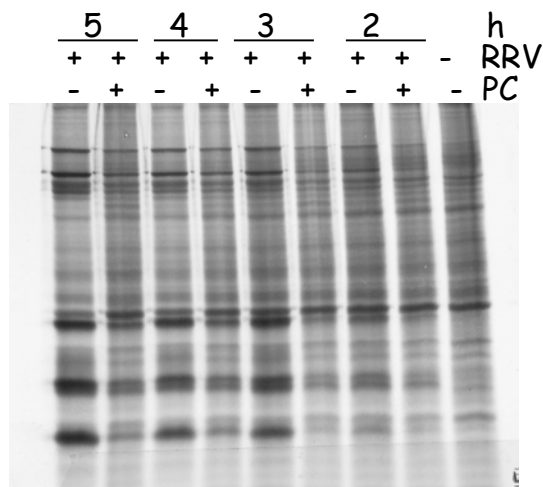


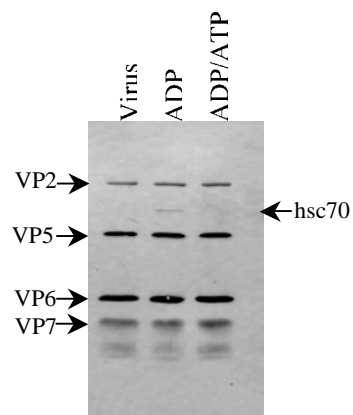
Fig. 8.2. Efecto del péptido C en la síntesis de proteínas virales. Se incuban las células con 2 mg/ml de péptido 30 min previo al virus, se adsorbe el virus por 60 min a 37°C, se deja diferentes tiempos de infección de 1 a 4 horas y después se agrega ^{35}S -metionina por 60 min a 37°C. Se lisan las células y finalmente se analizan las proteínas por SDS-PAGE.

* Efecto del intercambio de nucleótidos durante la interacción de hsc70 con partículas virales

En los ensayos en los que se incubaba el virus con hsc70 en presencia de diferentes nucleótidos, encontramos que cuando la hsc70 está en presencia de ADP, la proteína hsc70 se queda asociada a la partícula viral después de pasar a través de un colchón de sacarosa. Esto es porque cuando hsc70 está unida a ADP se forma un estado de alta afinidad con el sustrato y como además en la mezcla de reacción sólo hay ADP, no se da el recambio de nucleótido, por lo tanto no se libera el sustrato, y la proteína hsc70 queda unida al virus (35, 77). Se sabe que el recambio de ADP por ATP provoca la liberación del sustrato, por lo que se evaluó el efecto de adicionar ATP al complejo virus-hsc70-ADP, para evaluar si con el recambio de nucleótido se libera la partícula viral del complejo.

Para esto después de que el virus interacciona con hsc70 en presencia de ADP, se recuperaron las partículas virales que se pasaron por colchón de sacarosa (como se menciona en materiales y métodos), se agregó un exceso de ATP (10 mM) y se incubó la reacción otra vez a 37°C, después de lo cual la muestra se volvió a centrifugar a través de un colchón de sacarosa. Las partículas que se recuperaron del fondo se analizaron por inmunoblot, junto con un control al que no se le agregó un exceso de ATP (Fig. 8.3, carril ADP) y de virus sin incubar con hsc70 (Fig. 8.3, carril virus), pero centrifugados al mismo tiempo. De acuerdo con lo reportado (56, 64), encontramos que el recambio de ADP por ATP liberó a las TLPs del complejo, ya que cuando analizamos las fracciones recuperadas por inmunoblot encontramos que hsc70 ya no se encontraba presente en la muestra incubada con un exceso de ATP (Fig. 8.3, carril ADP/ATP), mientras que cuando sólo tenemos ADP en la muestra, hsc70 se mantuvo asociada a la partícula viral (Fig. 8.3, carril ADP).

Fig. 8.3. Efecto del intercambio de nucleótidos en la interacción de hsc70. 1.2 µg de virus RRV purificado y activado con tripsina se incubó con 1.6 µg de hsc70 por 60 min a 37°C en presencia de 1 mM ADP. Esta mezcla se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 40%. Se recuperó el complejo ADP-hsc70-TLPs del pellet (carril ADP en el gel) se incubó con un exceso de ATP y se centrifugó nuevamente (carril ADP/ATP en el gel). Las proteínas recuperadas de los sedimentos se analizaron por inmunoblot con una mezcla de suero de conejo hiperinmune contra hsc70 y rotavirus. El carril indicado como "virus" corresponde a virus sin hsc70 tratado en las mismas condiciones de tiempo y temperatura, centrifugado dos veces a través del colchón de sacarosa.



* Efecto de los ligandos de hsc70 sobre la infectividad de reovirus

Sabemos que los péptidos A y C, ligandos de hsc70, afectan la infectividad de rotavirus y que este efecto es a nivel de entrada, porque cuando se preincuban estos péptidos en las células se inhibe la infección, mientras que cuando los péptidos se adicionan después de que el virus ha entrado (60 min a 37°C), no tienen ningún efecto sobre su infectividad (Secc. 7, fig. 4). Sin embargo, para descartar que el efecto de la interacción de los péptidos con la membrana celular estuviera interfiriendo de forma inespecífica la entrada de rotavirus a la célula, evaluamos el efecto de los péptidos A y C sobre la infectividad de reovirus. Reovirus es un virus de la familia *Reoviridae*, capaz de infectar también las células MA104.

El ensayo de infectividad se hizo con el mismo formato que para rotavirus descrito en materiales y métodos, donde células MA104 se preincubaron con diferentes cantidades de los péptidos, incluido el péptido control y posteriormente se adsorbió el virus en las células. Encontramos que la infectividad de reovirus no se vió afectada por ninguno de los péptidos utilizados (Fig. 8.4), lo que indica que el efecto de la interacción de los ligandos de hsc70 es específico para la entrada de rotavirus.

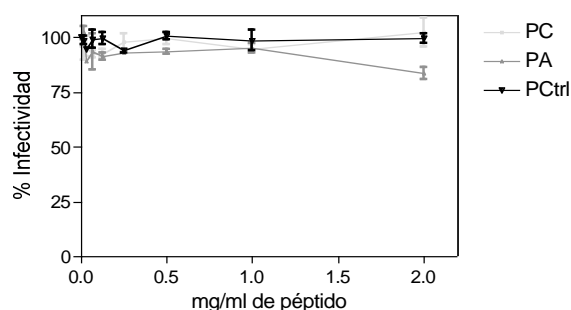
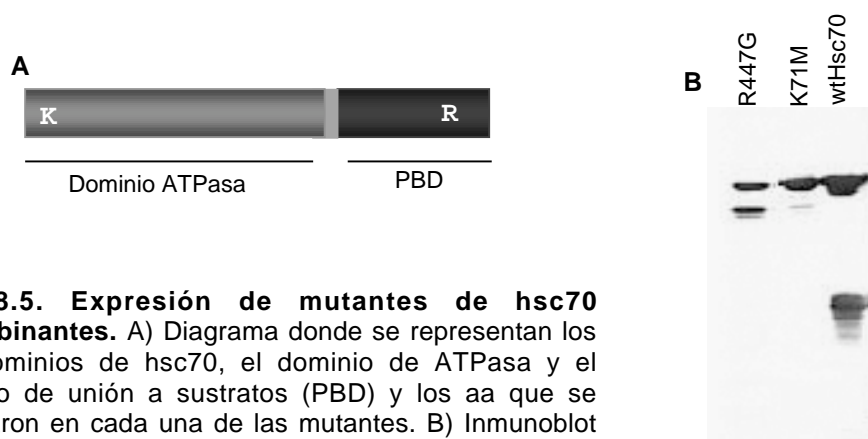


Fig. 8.4. Efecto de los ligandos de Hsc70 en la infección de reovirus. Células MA104 son preincubadas con diferentes concentraciones del péptido A (PA), C (PC) o control (Ctrl.) por 30 min a 37°C y después, el virus se adsorbe en las células por 60 min a 37°C, se lava y se deja la infección por 14 h a 37°C. Posteriormente las células se fijan y se hace una inmunotinción con un anticuerpo policlonal contra reovirus. Los resultados se expresan como porcentaje de infectividad del virus que se obtuvo de las células que se preincubaron con PBS como control. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado.

* Expresión y caracterización de dos proteínas mutantes de hsc70

Después de hacer los ensayos de interacción del virus con hsc70 en presencia de diferentes nucleótidos: ATP, ADP o ATP γ S, encontramos que con ATP la infectividad del virus se reduce 50%, con ADP se reduce un 30%, y en presencia de ATP γ S no hay reducción en la infectividad del virus (Secc. 7, fig 7B). Estos resultados sugieren que la inactivación del virus por hsc70 requiere de la hidrólisis de ATP, lo cual indica que la actividad de ATPasa de la chaperona podría estar participando en la inactivación del virus. Para evaluar esta posibilidad construimos dos mutantes de la proteína. La primera tiene una mutación puntual en el dominio de ATPasa, en el aminoácido 71, donde se cambia una lisina por una metionina (K71M) (Fig. 8.5). Esta mutante se ha reportado que puede unir sustratos, pero su función de ATPasa es inactiva (54). La segunda proteína mutante tiene una mutación puntual en el dominio de unión a ligandos, en el aminoácido 447, donde se cambia una arginina por una glicina (R447G) (Fig. 8.5). Esta mutante tiene un espectro por dicroísmo circular idéntico a la silvestre, pero presenta una deficiencia en su afinidad por los sustratos (36). Ambas mutantes se expresaron en bacteria con 6 histidinas unidas en su extremo carboxilo y se purificaron por cromatografía de afinidad.



Como parte de la caracterización de estas dos mutantes, K71M y R447G, se hizo un ensayo de renaturalización de luciferasa para evaluar su función de chaperona. Ninguna de las dos mutantes, como se ha reportado (36, 54), fue capaz de renaturalizar luciferasa (Fig. 8.6), mientras que la proteína recombinante hsc70 silvestre permite recuperar la actividad de la enzima desnaturalizada en un 40% (Fig. 8.6). Estos resultados sugieren que el fenotipo de cada una de las mutantes corresponde a lo que se ha descrito en la literatura; la proteína K71M no puede renaturalizar luciferasa porque tiene afectada su actividad de ATPasa y no hidroliza ATP, mientras que la proteína R447G no renaturaliza luciferasa porque cambio su afinidad por el sustrato.

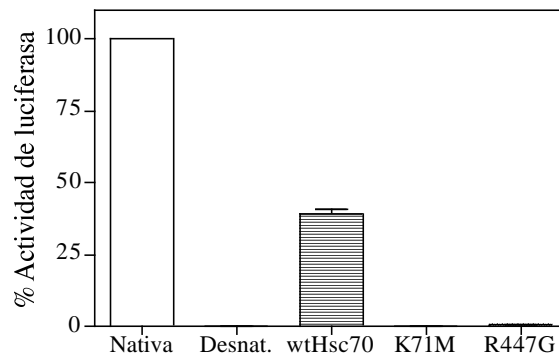


Fig. 8.6. Ensayo de actividad de luciferasa renaturalizada con las mutantes de hsc70. Se desnaturaliza la luciferasa como se indica en materiales y métodos, se incuba con cada una de las proteínas indicadas y posteriormente se determina la actividad de la luciferasa. La actividad de la luciferasa renaturalizada se determina comparando con la que se obtiene de la proteína nativa y la desnaturalizada. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado

A pesar de que ninguna de las dos mutantes fue capaz de renaturalizar luciferasa, quisimos evaluar si alguna de las dos, o ambas, pueden unirse al virus. Sabemos que en ensayos de ELISA el virus es capaz de unirse a hsc70 y a su dominio de unión a sustratos, así que se evaluó también por ELISA si las mutantes se podían unir o no al virus. Una placa de ELISA revestida con TLPs se incubó con cantidades crecientes de las diferentes proteínas recombinantes, K71M, R447G o wtHsc70, y la cantidad de proteína unida a la placa se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo contra hsc70.

Encontramos que K71M y R447G se unieron a las TLPs de forma dependiente de la concentración, similar a la unión de la hsc70 silvestre (Fig. 8.7). La mutante K71M no tiene afectado su dominio de unión a ligandos, así que es posible que interaccione con el virus igual que la hsc70 silvestre. Sin embargo, para la proteína R447G que tiene una mutación en el dominio de unión a ligandos no esperábamos que la unión con el virus fuera equivalente a la de hsc70 silvestre. Una posible explicación para este resultado es que se ha reportado que esta mutante si puede unir sustratos, pero su constante de disociación es mayor que la de hsc70 silvestre, por lo que los sustratos se disocian más rápido, por la cual no se puede renaturalizar luciferasa (36). Probablemente el ensayo de ELISA no es el más adecuado para caracterizar la interacción de la hsc70 R447G con el virus.

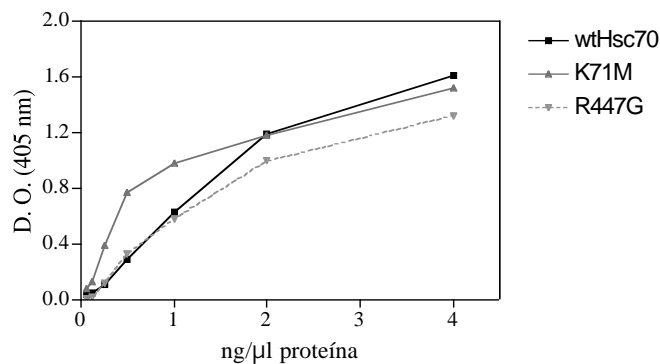


Fig. 8.7 Ensayos de unión virus a mutantes de hsc70. Placas de ELISA de 96 pozos tratadas con TLPs (200 ng/pozo) se incuban con la concentración indicada de proteína recombinante por 60 min a 37°C, y la cantidad de proteína unida se detecta con un anticuerpo policlonal de conejo contra hsc70 como se describe en materiales y métodos. La concentración de proteína recombinante presente en cada pozo se muestra como densidad óptica detectada a 405 nm.

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio, se reportó que la infección del virus se puede bloquear entre 40 y 50% si el virus se incubaba con la proteína recombinante hsc70. Como encontramos que las dos mutantes de hsc70 se pueden unir al virus en ensayos de ELISA, se evaluó su capacidad para bloquear la infectividad del virus. Alrededor de 2000 ffu de virus se incubaron por 90 min a 37°C con diferentes concentraciones de las proteínas recombinantes, K71M, R447G o hsc70, antes de infectar

las células. La infectividad del virus se inhibió alrededor de 50% con la mutante K71M y con la hsc70 silvestre (Fig. 8.8), pero la mutante R447G no bloqueó su infectividad (Fig. 8.8). Ya que en este ensayo el virus se incubó con hsc70-R447G en solución y no en fase sólida como en los ensayos de ELISA, en estas condiciones se pudo haber dissociado la proteína del virus perdiendo así su capacidad de bloquear la infección viral. Alternativamente la hsc70 presente en la membrana de la célula pudiera ser capaz de competir por el virus con la proteína R447G, mientras que con la silvestre o la K71M, que unen bien el sustrato, no logra desplazarlas en cuyo caso el bloqueo se daría porque el sitio de interacción de hsc70 estaría ocupado por la proteína recombinante.

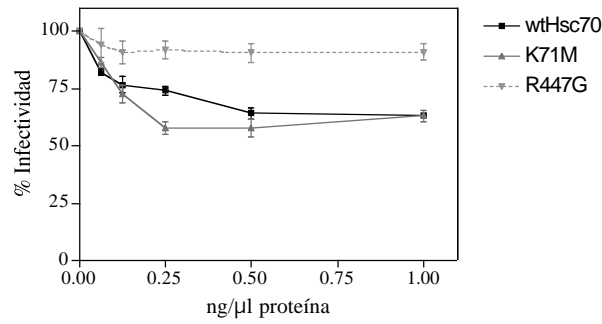


Fig. 8.8. Infectividad de RRV en presencia de las mutantes de hsc70. diferentes concentraciones de hsc70 se incuban con el virus por 60 min a 37°C. Después, el virus se adsorbe en las células por 60 min a 37°C, se lava y se deja la infección por 14 h a 37°C. Posteriormente las células se fijan y se hace una inmunotinción con un anticuerpo policlonal contra rotavirus. Los resultados se expresan como porcentaje de infectividad del virus que se obtuvo de las células que se preincubaron con PBS como control. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado.

* Infectividad de diferentes cepas de rotavirus

Se sabe que diferentes cepas de rotavirus tiene diferentes requerimientos para entrar a la célula, es decir que no todas las cepas interactúan con los mismos receptores de unión y post-unión reportados. Se ha descrito que la infectividad de algunas cepas se ve disminuida por un tratamiento a las células con neuraminidasa (NA), y a estas cepas se les conoce como NA-sensibles, mientras que hay otras cepas que no son afectadas y

se les denomina NA-resistentes (11, 47). También se ha descrito que algunas cepas pueden utilizar integrinas como receptores de unión o de post-unión (47, 86), mientras que otras cepas pueden infectar a las células de forma independiente de integrinas. El uso de las integrinas correlaciona con el serotipo de VP4 y es independiente del serotipo de VP7 o de la sensibilidad a NA del virus (29, 47).

Quisimos evaluar si independientemente de su dependencia o no por los ácidos siálicos, o por integrinas, las diferentes cepas de rotavirus interaccionaban con hsc70 durante el proceso de infección. Para esto seleccionamos cuatro cepas representativas de los grupos descritos hasta el momento (ver tabla 2) y evaluamos su infectividad en células preincubadas en presencia del péptido C, o cuando los virus fueron preincubados con la proteína hsc70 purificada.

Tabla 2. Características de las cepas utilizadas en función de su interacción con ácido siálico e integrinas

Cepa	Sensibilidad a Neuraminidasa	Uso de Integrinas	Serotipo VP4
RRV	S	D	3
UK	R	I	5
WA	R	D	8
TFR41	S	I	7

S = sensible; R = resistente; D = dependiente; I = independiente

Lo que encontramos es que cuando células MA104 son preincubadas con el péptido C, la infectividad de todos los virus se vio afectada, entre 50 y 75% con 2 mg/ml del péptido (Fig. 8.9B). Lo mismo encontramos cuando preincubamos los diferentes virus con la proteína recombinante hsc70, su infectividad se inhibió alrededor de un 40 y 50% (Fig. 8.9A). Estos resultados sugieren que aunque estos virus tengan diferentes requerimientos durante su proceso de entrada a la célula, todos interaccionan con la proteína hsc70, y que esto es independiente del serotipo de su proteína VP4.

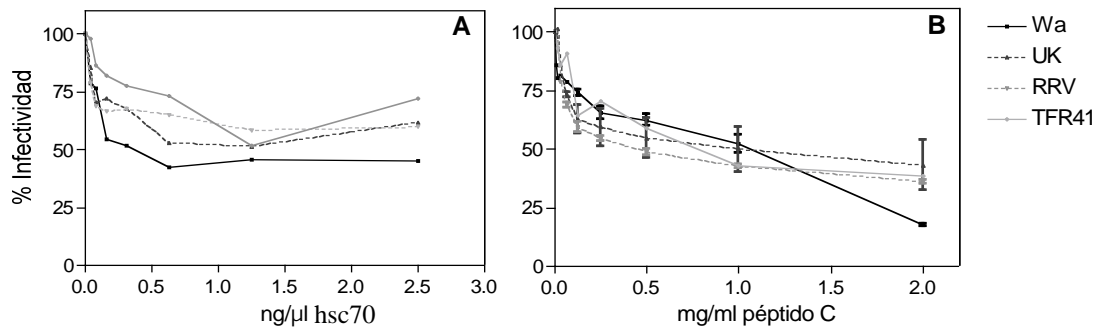


Fig. 8.9. Efecto de ligandos de Hsc70 en la infección de rotavirus. A) diferentes concentraciones de hsc70 se incuban con el virus por 60 min a 37°C y B) diferentes concentraciones del péptido C se preincuban en las células por 30 min a 37°C. Después, el virus se adsorbe en las células por 60 min a 37°C, se lava y se deja la infección por 14 h a 37°C. Posteriormente las células se fijan y se hace una inmunotinción con un anticuerpo policlonal contra rotavirus. Los resultados se expresan como porcentaje de infectividad del virus que se obtuvo de las células que se preincubaron con PBS como control. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado.

Evaluamos también la infectividad de estas cepas cuando células MA104 son preincubadas con diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal MA3-006, que reconoce a hsc70 y hsp70, y encontramos que el anticuerpo bloquea la infectividad de todas las cepas alrededor de 50% (Fig. 8.10A) y como se había reportado previamente para RRV (30). Esta inhibición se debe a la unión del anticuerpo a la hsc70 de la membrana, bloqueando la interacción del virus. El bloqueo es de la interacción virus-hsc70, porque aunque el anticuerpo puede reconocer a hsc70 y hsp70, cuando se preincubaron las células con diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal MA3-009, que sólo reconoce hsp70, encontramos que la infectividad de ninguna de las cepas se afecta (Fig. 8.10B). Además de esto, hsp70 no se ha descrito que esté presente en la superficie de células MA104 (30). Esto nuevamente sugiere que estas cuatro cepas interactúan con hsc70 en algún momento durante su entrada a la célula.

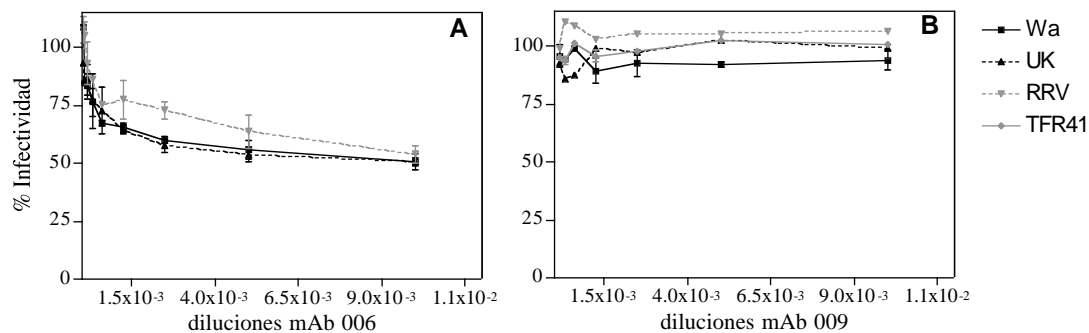


Fig. 8.10. Efecto de MAbs dirigidos contra hsc70 y hsp70 en la infección de rotavirus. Células MA104 son preincubadas con diferentes diluciones de MAb 006 por 90 min a 37°C (A) o con diferentes diluciones de MAb 009 por 90 min a 37°C (B). Después, el virus se adsorbe en las células por 60 min a 37°C, se lava y se deja la infección por 14 h a 37°C. Posteriormente las células se fijan y se hace una inmunotinción con un anticuerpo policlonal contra rotavirus. Los resultados se expresan como porcentaje de infectividad del virus que se obtuvo de las células que se preincubaron con PBS como control. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado.

9. DISCUSION

La proteína hsc70, miembro de la familia de las proteínas de choque térmico hsp70, se ha reportado que se encuentra presente en la superficie de diferentes líneas celulares (30, 51), incluyendo la línea celular MA104, que es susceptible a la infección por rotavirus, y donde se ha propuesto como receptor de post-unión en el proceso de entrada del virus a la célula. Rotavirus interactúa con la proteína hsc70 a través del dominio KID, localizado entre los aminoácidos 642 y 658 de la proteína VP5 (47, 85). En este trabajo encontramos que hsc70 interactúa específicamente con rotavirus a través de su dominio de unión a ligandos ya que:

- i) La proteína recombinante hsc70 completa y su dominio de unión a ligandos (PBD), pero no su dominio de ATPasa (AD), se unen a TLPs en un ensayo en fase sólida (ELISA).
- ii) La unión de hsc70 o PBD al virus se puede competir preincubando la proteína con la región carboxilo-terminal de VP5 (que contiene el dominio de VP5, que interactúa con hsc70), pero no con la región amino-terminal.
- iii) Ligandos de hsc70 (CMLA, PC, PA) compiten la unión de hsc70 a TLPs, en ensayos en fase sólida. Estos ligandos también bloquean la infectividad de rotavirus cuando se añaden a la célula antes de la infección, indicando que hsc70 en la superficie de las células MA104 interactúa con el virus a través de su dominio de unión a ligandos, y que esta interacción es importante para la entrada del virus a la célula.

La interacción de hsc70 con el virus durante el proceso de infección ocurre después de la unión del virus a la superficie celular, ya que si se preincuban células con anticuerpos contra hsc70, o se preincuba el virus con la chaperona, se bloquea la infección del virus, pero no su unión a la superficie de la célula (30). Se sabe que rotavirus induce la permeabilización temprana de la membrana celular, y que esta permeabilización se induce en un paso posterior a la unión inicial del virus a la superficie celular, probablemente durante la penetración de la partícula viral al citoplasma. Esta

permeabilización permite la co-entrada de toxinas como α -sarcina al interior celular, lo que inhibe la síntesis de proteínas (14, 45). Al preincubar las células con el péptido C o anticuerpos contra hsc70, encontramos que estos tratamientos no previnieron la co-entrada de α -sarcina, lo que indica que la interacción de hsc70 con el virus ocurre en un paso posterior a la permeabilización de la membrana celular; aunque queda por definir cuál es este paso.

El papel de hsc70 durante la infección por rotavirus no es claro, ya que se han descrito diferentes moléculas celulares como receptores, sin embargo el mecanismo de entrada no se conoce claramente, aunque se sabe que en algún punto durante el proceso de entrada, el virus pierde las proteínas de la capa externa, generándose así DLPs, transcripcionalmente activas. También se ha sugerido que los “rafts” participan en la entrada de rotavirus, y se ha encontrado que estos dominios tiene asociados algunos de los receptores descritos para rotavirus, entre ellos hsc70 (38). En principio, hsc70 pudiera servir como un sitio de anclaje para el virus, que facilitara el tránsito de la partícula viral al citoplasma de la célula. Alternativamente, en la interacción hsc70-virus pudiera estar implicada su función de chaperona, facilitando la remoción de las proteínas de la capa externa durante el tránsito del virus al citoplasma. Para saber si la función de chaperona de hsc70 estaba implicada en la interacción con el virus, se caracterizó esta interacción en ensayos *in vitro*. Los resultados obtenidos indican claramente que la reducción en la infectividad de rotavirus, inducida por su incubación con la proteína hsc70 recombinante depende de la actividad de ATPasa de la chaperona, ya que en presencia de un análogo de ATP no-hidrolizable, la hsc70 no fue capaz de inhibir la infectividad del virus. La reducción observada fue un poco más pronunciada en presencia de la co-chaperona hsp40; se sabe que las proteínas de la familia de hsp40 se unen a proteínas de la familia de hsp70, y su función es hacer específica y eficiente la función de las chaperonas, por eso se le conoce como co-chaperonas (25), sin embargo, éstas no son esenciales para la actividad de chaperona (15, 44, 79). Encontramos también que la infectividad del virus se inhibe cuando hsc70 está en presencia de ADP; sin embargo, la inhibición de la infectividad del virus en presencia de hsc70-ADP parecía ocurrir a través de un mecanismo diferente al que media la inhibición inducida por hsc70-ATP, ya que cuando analizamos las partículas que habían sido incubadas con hsc70 en presencia de ADP, éstas tenían asociada a la hsc70 después de pasar por un colchón de sacarosa, lo que no ocurre cuando se incuba el virus con hsc70-ATP. El mecanismo de reducción de la

infectividad por hsc70-ADP puede ser porque la hsc70 bloquea las interacciones del virus con la membrana celular, a través de un impedimento estérico, mientras que en presencia de ATP, la proteína hsc70 parece inducir un cambio conformacional en la partícula viral de carácter irreversible, que inactiva al virus. Esta diferencia de comportamiento de la interacción de la proteína hsc70 con el virus, parece entonces estar regulada por el nucleótido al que se encuentra asociada (ATP o ADP), lo cual concuerda con lo descrito en la literatura (77). Hsc70 puede tener dos conformaciones diferentes para el dominio de unión a ligandos, dependiendo de si tiene unido ATP o ADP al dominio de ATPasa (80). Cuando el ATP está presente, el sitio de unión a ligandos se encuentra en una conformación favorable para unir al sustrato, la unión del sustrato ejerce un efecto sobre el dominio de ATPasa que aumenta la hidrólisis de ATP, esta hidrólisis a su vez estabiliza el complejo hsc70-sustrato y recíprocamente el dominio de unión a ligandos ejerce un efecto sobre el dominio de ATPasa que favorece un recambio ADP/ATP y un estado de baja afinidad por el sustrato que promueve su liberación (77). Cuando la hsc70 está en presencia de un exceso de ADP (estado no fisiológico), se favorece la formación de un complejo de alta afinidad con el sustrato, y como no hay recambio ADP/ATP, no hay liberación del sustrato, ya que el ADP sólo puede ser removido del complejo hsc70-ADP-sustrato por un intercambio ADP/ATP (34, 77). En el citoplasma hay tanto ATP como ADP, pero la hsc70 tiene una mayor afinidad por ATP que por ADP ($K_D = 1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$, respectivamente) (9). Nuestros resultados indican que hay una interacción diferencial con el virus en presencia de ATP o ADP, a juzgar por la estabilidad del complejo hsc70-virus bajo diferentes condiciones. En presencia de ADP la chaperona se recupera del pellet después de centrifugar la mezcla de virus/hsc70 a través de un colchón de sacarosa, sugiriendo que la hsc70 se encuentra asociada a las partículas virales durante el paso de centrifugación y esto se confirma cuando a este complejo se le adiciona un exceso de ATP provocando que se libere el virus, y ya no se encuentre asociada hsc70 (Fig. 8.3). Además, cuando el virus se incubaba en presencia de ATP, la chaperona no se encuentra asociada al virus, sugiriendo que la interacción de hsc70-ATP con TLPs es de menor afinidad que la de hsc70-ADP.

La reducción en la infectividad del virus inducida por la incubación con hsc70 en presencia de ATP no ocurre porque el virus pierde alguna de sus proteínas de la capa externa. Aparentemente la interacción de hsc70 con el virus provoca un cambio conformacional en las proteínas del virus. Esta posibilidad se ve apoyada por el hecho de

que la reactividad de algunos anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la capa externa del virus reaccionan de manera diferencial con las TLPs tratadas o no con hsc70. De igual manera, la diferente susceptibilidad de estas partículas a la temperatura y pH, apoya la hipótesis del cambio conformacional de la partícula viral.

La participación de la actividad de ATPasa de hsc70 en la reducción de la infectividad del virus se demostró utilizando una mutante de hsc70 que no presenta su actividad de ATPasa (K71M). Se ha demostrado que esta mutante bloquea el reciclaje del receptor de transferrina, debido a que la clatrina no puede ser disociada de las vesículas endocíticas (53). Se sabe que esta mutante (K71M) tiene una deficiencia en su actividad de ATPasa; puede unir ATP y formar un complejo β,γ -bidentado con Mg^{2+} , que se ha propuesto como uno de los pasos intermedarios que se requieren para que se hidrolice el fosfato- γ del ATP. La mutante en la posición 71 permanece en el estado de liberación del sustrato en presencia de un exceso de ATP, tanto *in vitro* como *in vivo* (54). Esta hsc70 mutante no promueve la reducción de la infectividad del virus, el cual es un efecto similar al que se tiene cuando hsc70 está en presencia del análogo de ATP no hidrolizable, ATP γ S, donde tampoco se promueve la reducción de la infectividad del virus.

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que varios receptores de rotavirus han sido caracterizados, aún no se conoce el mecanismo por el cual los rotavirus entran a su célula huésped. Aparte de los ácidos siálicos (AS), varias otras moléculas han sido identificadas como posibles receptores de rotavirus en la superficie de las células MA104, entre las cuales están las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$, y la proteína de choque térmico hsc70. Sin embargo, estudios recientes sugieren que no todas las cepas de rotavirus utilizan integrinas para unirse y entrar a la célula huésped. Al comparar el efecto de ligandos y anticuerpos contra hsc70 en la infectividad de diferentes cepas, encontramos que la infectividad de todas se afecta de forma similar. Estos resultados sugieren que, independientemente de su utilización de AS o integrinas como serotipos, todas las cepas de rotavirus requieren de hsc70 para ingresar a la célula.

Con base en el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo es tentador hipotetizar que durante la infección a la célula, la interacción del virus con la hsc70 que se encuentra en la membrana de las células MA104 resulta en un cambio conformacional en la partícula viral que facilita o se requiere para su entrada al citoplasma celular. Sin

embargo, cuando esta interacción se da en solución (*in vitro*) en ausencia de la célula, provoca un cambio que inactiva al virus. Observaciones similares se han reportado para otros virus, como el virus de inmunodeficiencia humana (41, 82), el virus de sarcoma y leucosis aviaria (16, 28) y poliovirus (6, 66). En el caso de poliovirus, cuando la partícula viral interacciona con el receptor celular en solución, el virus sufre un rearrreglo conformacional, en el cual la proteína VP4 se libera de la partícula, cambiando su densidad y haciéndola no-infecciosa (6, 66). En conjunto nuestros resultados sugieren que la proteína hsc70 puede tener un papel activo en la infección de rotavirus, sirviendo no sólo de anclaje en la membrana celular durante el tránsito del virus al interior de la célula, sino ayudando también a su entrada a través de modificar la conformación de las proteínas virales de superficie, facilitando su remoción y generando DLPs, transcripcionalmente activas, que iniciarían el ciclo replicativo del virus en el interior de la célula.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **Arias, C., C. A. Guerrero, S. Zarate, P. Isa, R. Espinosa, P. Romero, E. Méndez, and S. López.** 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *In* I. D. C. a. J. A. Goode (ed.), *Gastroenteritis viruses*. John Wiley & Sons. Ltd., Chichester (Novartis Found Symp).
2. **Arias, C. F., M. Lizano, and S. López.** 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**:633-642.
3. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López.** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* **70**:5832-5839.
4. **Arispe, N., and A. De Maio.** 2000. ATP and ADP modulates a cation channel formed by hsc70 in acidic phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* **275**:30839-30843.
5. **Arnold-Schild, D., D. Hanau, D. Spehner, C. Schimid, H. Rammensee, H. Salle, and H. Schild.** 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat-shock protein by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **162**:3757-3760.
6. **Belnap, D. M., B. M. McDermott, Jr., D. J. Filman, N. Cheng, B. L. Trus, H. J. Zuccola, V. R. Racaniello, J. M. Hogle, and A. C. Steven.** 2000. Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:73-78.
7. **Boulanger, J., D. Faulds, E. M. Eddy, and C. A. Lingwood.** 1995. Members of the 70 kDa heat shock protein family specifically recognize sulfoglycolipids: role in gamete recognition and mycoplasma-related infertility. *J. Cell Physiol.* **165**:7-17.
8. **Brown, D. T., and E. London.** 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164**:103-114.
9. **Buxbaum, E., and P. Woodman.** 1996. Binding of ATP and ATP analogues to the uncoating ATPase hsc70 (70 kDa heat shock cognate protein). *J. Biochem.* **318**:923-929.
10. **Chang, T. C., C. D. Hsiao, S. J. Wu, and C. Wang.** 2001. The effect of mutating arginine-469 on the substrate binding and refolding activities of 70-kDa heat shock cognate protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **386**:30-36.
11. **Ciarlet, M., and M. K. Estes.** 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 4):943-8.
12. **Clapp, L. L., and J. T. Patton.** 1991. Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization. *Virology* **180**:697-708.

13. **Cripe, T., P. E. Delos, P. A. Estes, and R. L. Garcea.** 1995. In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J. Virol.* **69**:7807-7813.
14. **Cuadras, M., C. Arias, and S. López.** 1997. Rotavirus induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* **71**:9065-9074.
15. **Cyr, D. M., T. Langer, and M. G. Douglas.** 1994. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**:176-181.
16. **Damico, R., and P. Bates.** 2000. Soluble receptor-induced retroviral infection of receptor-deficient cells. *J. Virol.* **74**:6469-6475.
17. **Delorme, C., H. Brussow, J. Sidoti, N. Roche, K. A. Karlsson, J. R. Neeser, and S. Teneberg.** 2001. Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol.* **75**:2276-87.
18. **Estes, M. K.** 2001. Rotavirus and their replication., p. 1747-1785. *In* D. N. K. *In* B. N. Fields, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T. P. Manatih, B. Roizman and S.E, Strass (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, NY.
19. **Estes, M. K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**:410-419.
20. **Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, and C. P. Gerba.** 1979. Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen. Virol.* **43**:403-409.
21. **Ferrarini, M., S. Heltai, M. Zocchi, and C. Rugorli.** 1992. Unusual expression and localization of heat shock protein in human tumor cells. *Int. J. Cancer* **51**:613-619.
22. **Fewell, S. W., B. W. Day, and J. L. Brodsky.** 2001. Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **276**:910-914.
23. **Florin, L., K. A. Becker, C. Sapp, C. Lambert, H. Sirma, M. Müller, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2004. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires hsc70. *J. Virol.* **78**:5546-5553.
24. **Fourie, A., J. Sambrook, and M.-J. Gething.** 1994. Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **269**:30470-30478.
25. **Frydman, J.** 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:603-647.
26. **Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno.** 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* **172**:196-205.
27. **Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka, T. Konno, and N. Ishida.** 1987. Evidence for endocytosis-independent infection by human rotavirus. *Arch. Virol.* **97**:93-9.
28. **Gilbert, J. M., L. D. Hernandez, J. W. Balliet, P. Bates, and J. M. White.** 1995. Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* **69**:7410-7415.

29. **Graham, K., P. Halasz, Y. Tan, M. Hewish, Y. Takada, E. Mackow, M. Robinson, and B. Coulson.** 2003. Integrin-using rotavirus bind $\alpha 2\beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha X\beta 2$ and $\alpha V\beta 3$ by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* **77**:9969-9978.
30. **Guerrero, C. A., D. Bouyssonade, S. Zarate, P. Isa, T. López, R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, S. López, and C. F. Arias.** 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* **76**:4096-4102.
31. **Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. López, and C. F. Arias.** 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362-9371.
32. **Guerrero, C. A., S. Zarate, P. Isa, E. Mendez, S. López, and C. Arias.** 2000. Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14644-14649.
33. **Guo, C. T., O. Nakagomi, M. Mochizuki, H. Ishida, M. Kiso, Y. Ohta, T. Suzuki, D. Miyamoto, K. I. Hidari, and Y. Suzuki.** 1999. Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**:683-8.
34. **Ha, J. H., and D. McKay.** 1995. Kinetics of nucleotide-induced changes in the tryptophan fluorescence of the molecular chaperone hsc70 and its subfragments suggest the ATP-induced conformational change follows initial ATP binding. *Biochem.* **34**:11635-11644.
35. **Hammond, C., and A. Helenius.** 1994. Folding VSV G protein sequential interaction with Bip and calnexin. *Science* **266**:456-458.
36. **Hu, S., P. Liang, C. Hsiao, and C. Wang.** 2002. Characterization of the L399P and R447G mutants of hsc70: the decrease in refolding activity is correlated with an increase in the rate of substrate dissociation. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**:135-141.
37. **Isa, P., S. López, L. Segovia, and C. F. Arias.** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J. Virol.* **71**:6749-56.
38. **Isa, P., M. Realpe, P. Romero, S. López, and C. F. Arias.** 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**:370-81.
39. **Jindal, S., and Y. R. A.** 1992. Vaccinia virus infection induces stress response that leads to association of hsp70 with viral proteins. *J. Virol.* **66**:5357-5362.
40. **Jindal, S., and M. Malkausky.** 1994. Stress response to viral infection. *Trends Microbiol.* **2**:89-90.
41. **Jones, P. L., T. Korte, and R. Blumenthal.** 1998. Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J. Biol. Chem.* **273**:404-409.
42. **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.

43. **Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, and R. M. Chanock.** 2001. Rotavirus., p. 1787-1833. *In* D. N. K. *In* B. N. Fields, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T. P. Manatih, B. Roizman and S.E, Strass (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, NY.
44. **Kelley, W. L.** 1998. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* **23**:222-227.
45. **Liprandi, F., Z. Moros, M. Gerder, J. E. Ludert, F. H. Pujol, M. C. Ruiz, F. Michelangeli, A. Charpilienne, and J. Cohen.** 1997. Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor alpha-sarcin. *Virology* **237**:430-438.
46. **López, S., and C. Arias.** 2003. Attachment and post-attachment receptors for rotavirus., p. 143-163. *In* U. Desselberger, Gray, J. (ed.), *Viral gastroenteritis*, vol. 9. Elsevier, Amsterdam.
47. **López, S., and C. F. Arias.** 2004. Rotavirus entry into cells: a versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**:251-300.
48. **López-Buesa, P., C. Pfund , and E. Craig.** 1998. The biochemical properties of the ATPase activity of a 70-kDa heat shock protein (hsp70) are governed by the C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15253-15258.
49. **Macejak, D. G., and P. Saraow.** 1992. Association of heat shock protein 70 with enterovirus capsid precursor P1 in infected human cell. *J. Virol.* **66**:1520-1527.
50. **Mendez, E., S. López, M. Cuadras, P. Romero, and C. Arias.** 1999. Entry of rotavirus is a multiple step process. *Virology* **263**:450-459.
51. **Multhoff, G., and L. E. Hightower.** 1996. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Strees Chaperone* **1**:167-172.
52. **Muvley, M., and D. T. Brown.** 1995. Involment of the molecular chaperone Bip in maturation of sindbis virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **69**:1621-1627.
53. **Newmyer, S. L., and S. L. Schmid.** 2001. Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J. Cell Biol.* **152**:607-620.
54. **O'Brien, M., K. Flaherty, and D. McKay.** 1996. Lysine 71 of the chaperone protein hsc70 is essential for ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **271**:15874-15878.
55. **Ohgitani, E., K. Kobayashi, K. Takeshita, and J. Imanishi.** 1999. Biphasic translocation of a 70 kDa heat shock protein in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **80 (Pt 1)**:63-8.
56. **Palleros, D. R., K. L. Reid, L. Shi, W. J. Welch, and A. L. Fink.** 1993. ATP-induced protein-hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature* **365**:664-666.
57. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. López.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190-200.
58. **Parashar, U. D., J. S. Bresee, J. R. Gentsch, and R. I. Glass.** 1998. Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:561-70.

59. **Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass.** 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:565-72.
60. **Petrie, B. L., D. Y. Graham, and M. K. Estes.** 1981. Identification of rotavirus particle types. *Intervirology* **16**:20-8.
61. **Prange, R., M. Werr, and M. Loffler-Mary.** 1999. Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. *Biol. Chem.* **380**:305-314.
62. **Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu.** 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* **199**:269-75.
63. **Prasad, B. V. V. a. M. K. E.** 2000. Electron criomicroscopy and computer image processing techniques: use in the structure/funtion studies of rotavirus, p. 9-31. *In I. J. G. a. U. Desselberger* (ed.), *Rotavirus methods and protocols*, vol. 34. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
64. **Prasad, K., J. Heuser, E. Eisenberg, and L. Greene.** 1994. Complex formation between clathrin and uncoating ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**:6931-6939.
65. **Quan, C. M., and F. W. Doane.** 1983. Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology* **20**:223-31.
66. **Racaniello, V. R.** 1996. The poliovirus receptor: a hook, or an unzipper? *Structure* **4**:769-773.
67. **Reyes-del Valle, J., S. Chávez-Salinas, F. Medina, and R. M. del Angel.** 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* **79**:4557-4567.
68. **Rolsma, M. D., T. B. Kuhlenschmidt, H. B. Gelberg, and M. S. Kuhlenschmidt.** 1998. Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J. Virol.* **72**:9079-91.
69. **Ruiz, M. C., J. Cohen, and F. Michelangeli.** 2000. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* **28**:137-49.
70. **Sagara, J., and A. Kawai.** 1992. Identification of heat shock protein 70 in rabies virion. *Virology* **190**:845-848.
71. **Sagara, Y., C. Ishida, Y. Inoue, H. Shiraki, and Y. Maeda.** 1998. 71-Kilodalton heat shock cognate protein acts as a cellular receptor for syncytium formation induced by human T-cell lymphotropic virus type 1. *J. Virol.* **72**:535-541.
72. **Sainis, L., C. Angelids, G. N. Pagoulatos, and L. Lazardis.** 2000. Hsc70 interaction with SV40 vira proteins differ between permissive and nonpermissive mamalian cells. *Cells Stress and Chap.* **5**:132-138.
73. **Sanchez-San Martin, C., T. López, C. F. Arias, and S. López.** 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**:2310-8.
74. **Schneider-Schaulies, J.** 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **81**:1413-29.

75. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-72.
76. **Speth, C., M. Prohaszka, M. Mair, G. Stockl, X. Zhu, B. Jobstl, and L. Gerace.** 1999. A 60 kD heat-shock protein-like molecule interacts with the HIV transmembrane glycoprotein gp41. *Mol. Immunol.* **36**:619-623.
77. **Takeda, S., and D. McKay.** 1996. Kinetics of peptide binding to the bovine 70 kDa heat shock cognate protein, a molecular chaperone. *Biochem.* **35**:4636-4644.
78. **Triantafilou, K., D. Fradelizi, K. Wilson, and M. Triantafilou.** 2002. Grp78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J. Virol.* **76**:633-643.
79. **Walsh, P., D. Bursac, Y. C. Law, D. Cyr, and T. Lithgow.** 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* **5**:567-571.
80. **Wilbanks, S. W., and D. McKay.** 1993. How potassium affects the activity of the molecular chaperone hsc70. *J. Biol. Chem.* **270**:2251-2257.
81. **Wu, X., X. Zhao, L. Baylor, S. Kaushal, E. Eisenberg, and L. E. Greene.** 2001. Clathrin exchange during clathrin mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **155**:291-300.
82. **Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardin, J. Robinson, and J. Sodroski.** 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J. Virol.* **69**:5723-5733.
83. **Yeager, M., J. A. Berriman, T. S. Baker, and A. R. Bellamy.** 1994. Three-dimensional structure of the rotavirus hemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *Embo J* **13**:1011-8.
84. **Yeager, M., K. A. Dryden, N. H. Olson, H. B. Greenberg, and T. S. Baker.** 1990. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell. Biol.* **110**:2133-44.
85. **Zarate, S., M. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. Juárez, M. Camacho-Nuñez, C. Arias, and S. López.** 2003. Interaction of rotavirus with hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* **77**:7254-7260.
86. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, C. F. Arias, and S. López.** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* **74**:593-599.