



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE
MORFOGÉNESIS DE ROTAVIRUS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

BIÓL. MARGARITA LAURA ZAYAS LÓPEZ



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.

El presente trabajo, fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Insituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 181553.

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	6
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
Resultados y discusión	28
Conclusiones	46
Perspectivas	47
Bibliografía	50

Resumen

Los rotavirus están formados por tres capas concéntricas de proteínas que envuelven al genoma viral, el cual está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena, cada segmento codifica para una proteína, a excepción del segmento 11, que codifica para dos proteínas. Durante el ciclo viral, en la célula infectada se traducen 12 proteínas virales, de las cuales seis son no estructurales (NSP) y seis estructurales (VP). De éstas, 10 son traducidas en ribosomas libres en el citosol y dos N-glicoproteínas, VP7 y NSP4, son traducidas en ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE), donde al mismo tiempo que se traducen se van insertando en la membrana del RE. Durante la infección se forman en el citoplasma sitios especializados llamados viroplasma, los cuales consisten en acumulaciones de proteínas y RNAs virales. En estos sitios es donde se replica el genoma del virus y en donde se ensamblan las partículas de dos capas o DLPs. Posteriormente, estas DLPs geman a través de la membrana del RE en donde se lleva a cabo la maduración del virus. Al parecer, la gemación está dada por una interacción entre la proteína NSP4, que sirve como un receptor intracelular, y la proteína VP6, que forma la capa externa de las DLPs. Durante la gemación, las DLPs adquieren una envoltura lipídica transitoria en la que se encuentran VP7, NSP4, y probablemente VP4, formando así la partícula intermediaria envuelta en membrana (PIEM). Posteriormente, esta envoltura lipídica es removida junto con NSP4, y las proteínas VP4 y VP7 se ensamblan para formar la tercera capa, formando así el virion maduro o TLP. El mecanismo más preciso de este proceso se desconoce. Recientemente, encontramos que al inhibir la expresión de VP7, mediante la interferencia de RNA (RNAi), se detiene la morfogénesis del virus en el estadio de PIEM. Para estudiar este proceso, aislamos y caracterizamos las PIEM. Para incrementar la cantidad de PIEM:

1) se silenció la expresión de VP7 y 2) la N-glicosilación fue inhibida. Las PIEM se aislaron en gradientes discontinuos de Optiprep y su composición proteica fue determinada. Encontramos que las PIEM control; 1) contienen a VP4, VP7 y NSP4 además de las proteínas de la DLP. El tratamiento con tripsina mostró que solamente VP4 y NSP4 fueron susceptibles a la proteólisis. Bajo el tratamiento con Tritón X-100, sólo la NSP4 dejó de formar parte de la partícula, mientras que VP4 y VP7 permanecieron asociadas a ella. 2) En las PIEM aisladas de células infectadas, tratadas con tunicamicina, encontramos que NSP4 y VP7 no fueron glicosiladas; el tratamiento con tripsina degradó completamente a VP4 y VP7. 3) Cuando la expresión de VP7 fue silenciada por RNAi, encontramos que las PIEM obtenidas contienen a VP4 y NSP4. En conclusión, encontramos que la inhibición de la glicosilación causa que las proteínas de la tercera capa, VP4 y VP7, se vuelvan más susceptibles a la degradación por tripsina, sugiriendo que estas proteínas no pueden plegarse en su forma nativa, dejando como resultado que el proceso de maduración normal del virus no pueda llevarse a cabo correctamente.

Introducción

Generalidades

Los rotavirus fueron inicialmente caracterizados como agentes causantes de gastroenteritis en animales; sin embargo, numerosos estudios epidemiológicos también han demostrado que son la causa más importante de gastroenteritis severa en niños menores de dos años. Aunque los adultos también pueden infectarse, la infección en ellos es menos severa (36).

Los rotavirus forman un género dentro de la familia *Reoviridae*. Entre sus características más sobresalientes están: 1) el genoma se conforma por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA_{dc}) que codifican para seis proteínas no estructurales (NSP1, 2, 3, 4, 5 y 6) y seis proteínas estructurales (VP1, 2, 3, 4, 6 y 7); 2) las partículas virales maduras tienen una simetría icosaédrica T=13, miden aproximadamente 100 nm de diámetro y están formadas por tres capas concéntricas de proteínas; 3) las partículas virales contienen una RNA polimerasa dependiente de RNA, responsable de transcribir y replicar el genoma; 4) el genoma segmentado de estos virus es capaz de rearrreglarse genéticamente; 5) la replicación del virus ocurre en el citoplasma de las células infectadas; 6) el tratamiento con enzimas proteolíticas facilita el crecimiento del virus en células de cultivo; 7) estos virus tienen una ruta morfogénica muy particular: las partículas virales inmaduras geman hacia el interior del retículo endoplásmico (RE) donde llevan a cabo su maduración; 8) los rotavirus maduros no tienen envoltura lipídica y se liberan de las células infectadas por la lisis celular o por el transporte vesicular no clásico en células epiteliales polarizadas (24).

Los rotavirus se clasifican serológicamente en varios grupos (serogrupos) que constan de múltiples serotipos. Cada serogrupo está conformado por rotavirus que comparten antígenos detectados por pruebas serológicas. Hasta ahora los rotavirus se han

clasificado en siete grupos (A a G). Los grupos A, B y C son más comúnmente encontrados en humanos y animales, mientras que los grupos D, E, F y G han sido hallados sólo en animales. El genoma de los virus se puede rearrreglar entre los miembros de cada grupo; sin embargo, esto no sucede entre virus de diferentes grupos (24, 75). Los determinantes antigénicos característicos de cada grupo están dados por las proteínas estructurales. Los rotavirus del grupo A son los principales causantes de gastroenteritis infecciosa en niños. Los rotavirus del grupo B se han asociado a epidemias anuales de diarreas severas principalmente en adultos. El grupo C se ha detectado esporádicamente en heces fecales de niños con diarrea y en brotes severos, principalmente en China (24, 64).

Los grupos de rotavirus se clasifican en diferentes serotipos y genotipos. Los primeros se han caracterizado por ensayos de neutralización con anticuerpos policlonales, mientras que los segundos están determinados por análisis de hibridación, o por la secuencia de los diferentes genes. La clasificación de los rotavirus se basa en un sistema binario. En éste, los diferentes serotipos de VP4 y de VP7 se reconocen por los epítopes de neutralización que presentan estas dos proteínas de la capa externa. Se han clasificado 14 serotipos **G** basados en la proteína VP4 y 13 serotipos **P** (incluyendo 3 subtipos) con base en la glicoproteína VP7. Al clasificar un rotavirus se debe incluir ambos serotipos; por ejemplo, la clasificación de la cepa humana Wa es: Wa (hu) G1/P1A (13, 24, 31, 38).

Características de la partícula viral

Estudios realizados por microscopía electrónica han permitido observar tres tipos de partículas (Fig.1). Las partículas que presentan una sola capa denominada nucleocápside o core; las partículas formadas por dos capas proteicas o DLPs (double-layered particles); y las partículas maduras formadas por las tres capas de proteínas o TLPs (triple-layered particles). Las nucleocápsides están conformadas por 120 moléculas de la proteína VP2

arreglada como 60 dímeros que envuelven al genoma y a pequeñas cantidades de las proteínas VP1 y VP3. Cada nucleocápside posee una simetría T=1 y no es infecciosa. Las DLPs constan de una nucleocápside cubierta por una capa formada por 780 moléculas de la proteína VP6 en un arreglo de simetría icosaédrica T=13. Esta partícula no es infecciosa pero es activa en transcripción. La proteína VP6 puede dissociarse de las DLPs si éstas son tratadas con agentes caotrópicos como el CaCl_2 y el NaSCN (Fig. 1). Las partículas infecciosas son las TLPs. Éstas presentan tres capas concéntricas de proteínas. La tercera capa de estas partículas está conformada por 60 espículas de la proteína VP4, que se proyectan a lo largo de una superficie lisa formada por trímeros de la glicoproteína VP7, que envuelven a las DLPs. Esta capa externa puede ser removida por agentes quelantes como el EDTA o EGTA, perdiendo así la infectividad (Fig. 1) (24, 25, 59, 60).

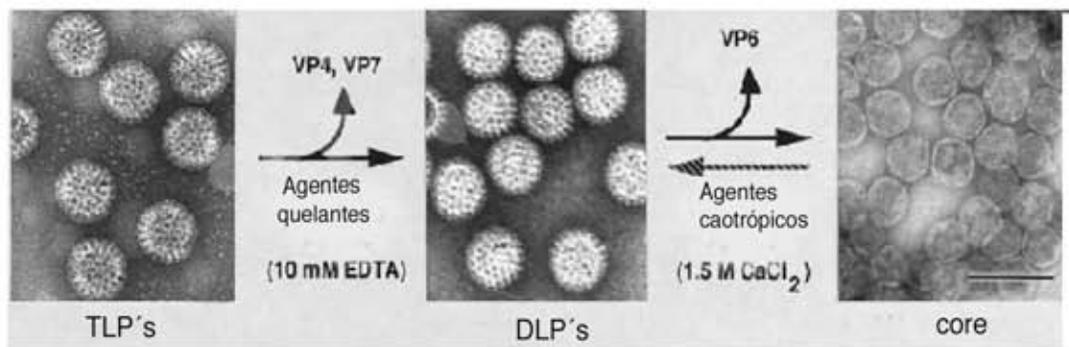


Figura 1. Microscopía Electrónica de las partículas virales. La barra representa 100 nm. (tomada del libro de Virology de Fields *et al* (24).

Las TLPs, las DLPs y las nucleocápsides pueden ser separadas por centrifugación en gradientes de CsCl o en gradientes de sacarosa, ya que poseen distintas densidades y coeficientes de sedimentación. Las TLPs tienen una densidad de 1.36 g/cm^3 en gradientes de CsCl y un coeficiente de sedimentación de 520S a 530S en gradientes de sacarosa; mientras que las DLPs tienen una densidad de 1.38 g/cm^3 y un coeficiente de

sedimentación de 380S a 400S. Las nucleocápsides tienen una densidad de 1.44 g/cm³ en CsCl y un coeficiente de sedimentación de 280S en sacarosa (9, 24).

Genoma

El genoma viral está constituido por 11 segmentos de RNAdc contenidos dentro de la nucleocápside. Los tamaños de cada segmento varían desde 660 pb del gen más pequeño hasta 3300 pb para el gen más grande (Tabla 1 y Fig. 2). Cada segmento codifica para una proteína a excepción del segmento 11 que presenta dos marcos abiertos de lectura que codifican para dos proteínas no estructurales (NSP5 y NSP6). De las doce proteínas: seis son proteínas estructurales que forman a las partículas virales y seis son proteínas no estructurales que se sintetizan en las células infectadas y que no están presentes en la partícula madura. Estas proteínas no estructurales participan en la replicación del virus y en la morfogénesis de la partícula viral (1).

Tabla1. Asignamiento génico y funcional de la cepa de simio SA11 de Rotavirus

Gen	Tamaño (bp)	Proteína	Peso Molecular (kDa)	Localización en Partículas	No. de copias por partícula	FUNCIÓN
1	3,302	VP1	125	NC	12	RNA polimerasa dependiente de RNA
2	2,690	VP2	94	NC	120	Unión a RNA, formación de nucleocápside
3	2,591	VP3	88	NC	12	Guanilil-transferasa
4	2,362	VP4	88	TLP	120	Proteína de unión a la célula
5	1581	NSP1	53	NS	0	Unión a RNA, proteína más variable del género
6	1356	VP6	41	DLP	780	Contiene determinantes antigénicos de grupo y subgrupo
7	1104	NSP3	34	NS	0	Unión a eIF-4G, unión al extremo 3' de los genes virales
8	1059	NSP2	35	NS	0	Unión RNA, probable actividad de NTPasa
9	1062	VP7	38	TLP	780	Glicoproteína con determinantes antigénicos de serotipo
10	751	NSP4	28	NS	0	Enterotoxina, receptor en RE
11	667	NSP5	26	NS	0	Fosfoproteína
		NSP6	10	NS	0	Producto del ORF2 del gen 11
NC nucleocápside TLP Partícula con tres capas DLP Partícula con dos capas NS Proteína no estructural						

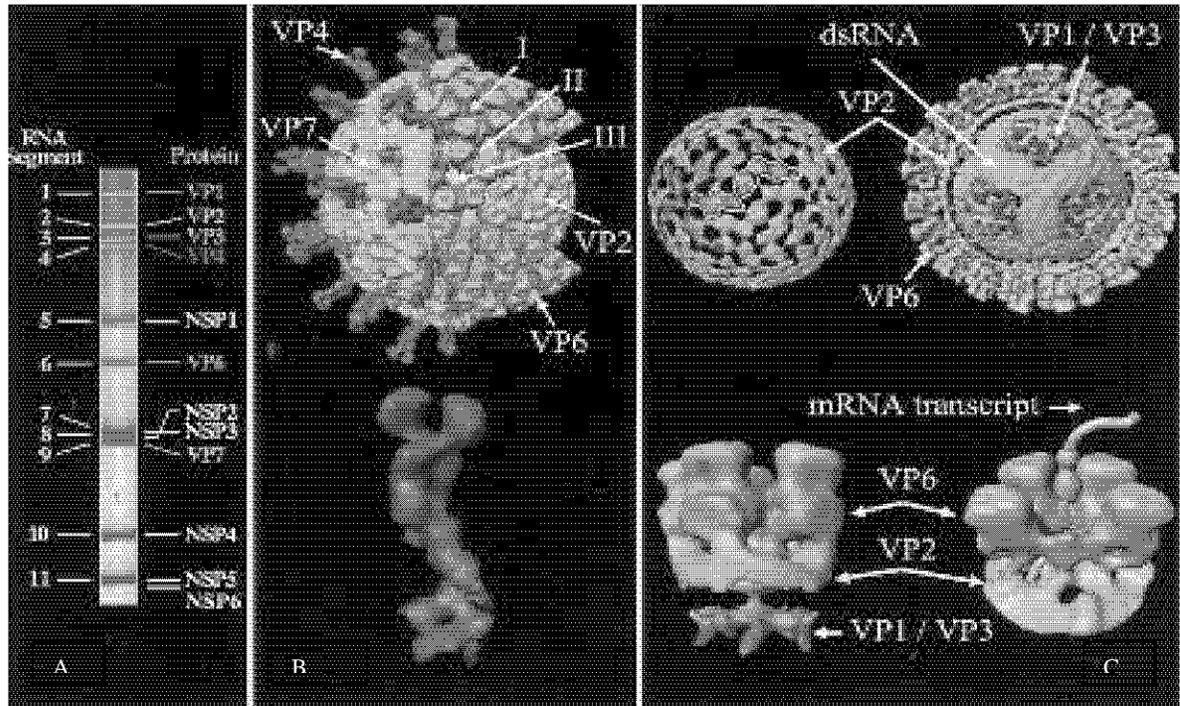


Fig. 2. Asignamiento genético y representación tridimensional de la estructura de las partículas de rotavirus. A) se muestra un gel de poliacrilamida donde se observan los 11 segmentos de RNAdc del genoma del rotavirus de simio SA11 y se indican las proteínas codificadas por cada segmento. B) se muestra la estructura tridimensional de la partícula viral en donde se observan las capas: externa (conformada por VP4 y VP7), intermedia (VP6) e interna (VP2); así como los tres tipos de canales que se observan en las partículas (I, II y III). También se ilustra la estructura de una espícula de VP4, donde se observa la naturaleza dimérica de la espícula. C) en la parte superior se observa la estructura tridimensional de la nucleocápside, en la parte inferior se muestra el complejo enzimático conformado por VP1 y VP3, y el RNA mensajero viral naciente el cual sale a través de un canal de tipo I formado por VP2 y VP6. Tomada del libro de Virology de Fields *et al* (24).

Ciclo replicativo

El tropismo natural de los rotavirus son las células epiteliales del intestino delgado. Debido a las dificultades de mantener en cultivo este tipo de células epiteliales diferenciadas, el estudio de los rotavirus se ha desarrollado principalmente en células epiteliales de riñón de mono *Rhesus* MA104 en donde el virus se replica eficientemente. En estas células el ciclo replicativo de rotavirus tiene una duración de 12-16 horas (Fig. 3) (39).

Los primeros eventos en el ciclo replicativo son la unión y la penetración del virus a la célula. Los rotavirus requieren interactuar con más de una molécula de la superficie

celular para entrar a la célula. Durante este proceso usan diferentes dominios de las proteínas VP4 y VP7 que forman la tercera capa de las TLPs.

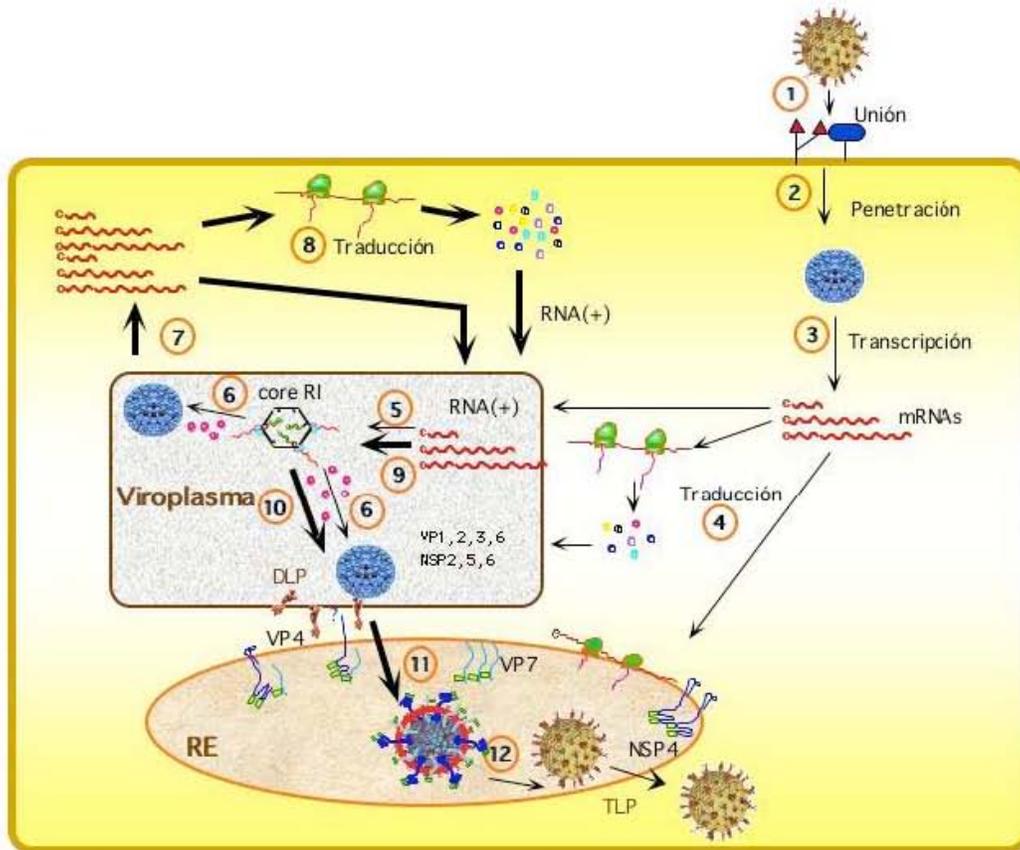


Fig. 3. Ciclo replicativo de rotavirus. Los diferentes pasos del ciclo replicativo del virus se muestran indicados con números- 1: unión del virus a la superficie celular; 2: penetración y pérdida de la capa externa de la partícula viral para producir la DLP; 3: transcripción primaria a partir del genoma de RNAdc; 4: síntesis de las proteínas virales; 5: ensamblaje de los cores RI y síntesis del RNA de cadena sencilla polaridad (-); 6: ensamblaje de las DLPs; 7: transcripción secundaria de las DLPs; 8: síntesis secundaria de proteínas virales; 9: ensamblaje de los cores RI y síntesis secundaria del RNA; 10: ensamblaje secundario de las DLPs; 11: gemación de las DLPs a través de la membrana del RE, y adquisición de la membrana transitoria; 12: pérdida de la membrana transitoria y generación y maduración de los virus de tres capas o TLPs. Modificado de (2).

La proteínas celulares involucradas en este paso son: un receptor que contiene ácido siálico (AS), el cual aún no ha sido determinado. Se ha propuesto a los gangliosidos GM1 o GM3 como posibles candidatos, aunque también se ha sugerido que los AS que presentan las integrinas podrían jugar este papel. Posteriormente, el rotavirus interactúa con las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y la proteína de choque térmico hsc70 (3, 39). Una vez que el virus

entra a la célula, pierde las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, quedando como DLP. La DLP que es activa en transcripción empieza a transcribir los RNAs virales. Estos RNAs virales sirven como templado para la traducción de las proteínas virales y para la síntesis del genoma de RNAdc. La replicación del virus y los primeros eventos de morfogénesis se llevan a cabo en el citoplasma, en unos sitios llamados viroplasma. En este sitio es donde se forma el RNAdc, la nucleocápside y las partículas de dos capas o DLPs (1, 58). Posteriormente las DLPs geman hacia el lumen del RE, adquiriendo durante este proceso una membrana transitoria, la cual se remueve para formar los viriones maduros o TLPs. Finalmente los virus se liberan de las células infectadas por la lisis celular o por el transporte vesicular no clásico en células epiteliales polarizadas (24).

Las proteínas VP4, VP7 y NSP4 se encuentran involucradas en los últimos pasos de la morfogénesis de rotavirus, estos son: el proceso de gemación de las DLP hacia el lumen del RE, la remoción de la envoltura lipídica y la formación de la tercera capa de la TLP.

VP4 es una proteína de 776 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 88 kDa (Fig. 4). Esta proteína se corta con tripsina generando dos polipéptidos: **VP8** que abarca de los aminoácidos 1 al 231, que presenta un peso molecular de 28 kDa; y **VP5** que abarca los aminoácidos 247 a 776, con un peso molecular de 60 kDa. Estos polipéptidos representan los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. El corte con tripsina de VP4 aumenta la penetración del virus a la célula pero no la unión a su receptor celular. Los cortes con tripsina se dan en las argininas 231, 241, y 247. Estas argininas se encuentran conservadas en todas las secuencias de VP4 de los rotavirus hasta ahora reportadas. Se ha relacionado el corte de la Arg 247 con el incremento de la infectividad (5, 28, 40).

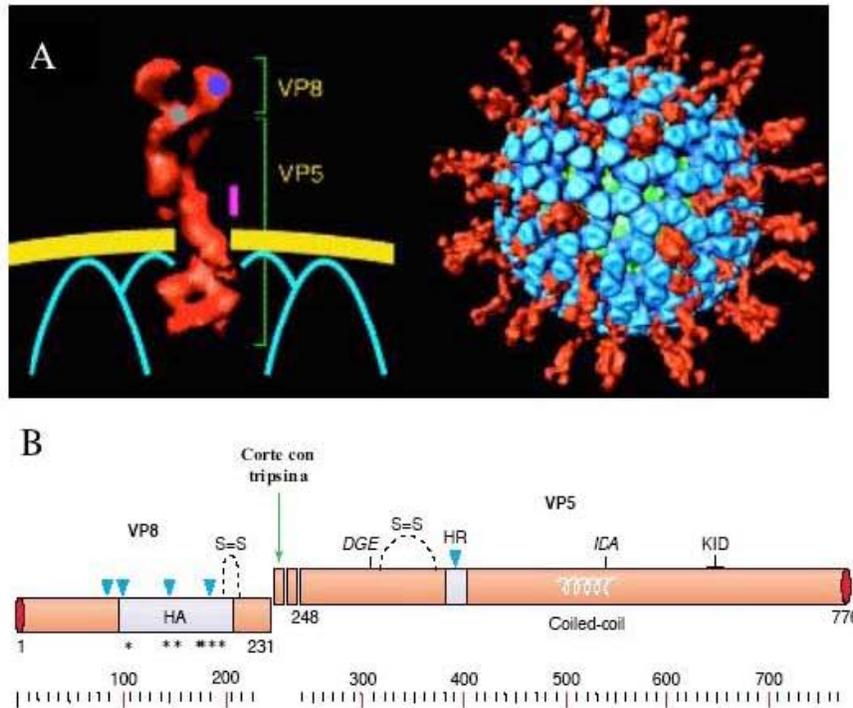


Fig. 4. Esquema de las propiedades de la proteína estructural VP4. A) Reconstrucción de la la partícula viral por criomicroscopía electrónica. Izquierda. Representación esquemática de las interacciones de VP4 (rojo) con la capa de VP7 (amarillo) y con los trímeros de VP6 (línea azul). Se muestran la localización del dominio al AS (violeta) y el dominio putativo de fusión (círculo gris). La barra rosa muestra el sitio de unión a Hsc70. Derecha. La capa de VP7 se removió de la reconstrucción para apreciar la interacción de VP4 con la capa intermedia formada por VP6 (azul). B) En esta representación de VP4 se muestra: La región donde se encuentran los sitios de corte con tripsina (Ø), la cual define el límite entre VP8 y VP5. El dominio de hemaglutinación (HA) (aa 93 a 208), los asteriscos marcados por debajo del dominio HA indican los aa 150 y 188 al 190, los cuales son importantes para la unión a ácido siálico (AS) de esta proteína. Los puentes disulfuro entre las Cys 203 y Cys 216, y entre las Cys 318 y Cys 330, se indican como S=S. En VP5, se muestra la posición de las secuencias DGE e IDA, que son motivos de unión, y podrían ser reconocidos por las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, respectivamente. Se muestra le región hidrofóbica (HR), la cual ha sido propuesta como un posible dominio de fusión, y un dominio de “coiled coil”. Modificado de (39).

Diferentes estudios indican que la proteína VP4 de los rotavirus animales presenta dos puentes disulfuro intracadena: uno en VP8 y otro en VP5, mientras que la proteína VP4 de los rotavirus humanos parecen tener un solo puente disulfuro presente en la proteína (51). La proteína VP4 de origen animal tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos *in vitro*, a esta actividad se le llama hemaglutinación y está directamente relacionada con la capacidad de unión del virus al AS presente en las membranas de los eritrocitos. Esta actividad no se encuentra en las proteínas VP4 de origen humano. La proteína VP4 de algunas cepas

presenta un dominio de hemaglutinación (HA) que comprende los aminoácidos 93 a 208 (26) de la proteína VP8, siendo los aminoácidos 155 y 188-190 los más importantes en la actividad de unión al AS (32). Los puentes disulfuro se encuentran localizados entre la Cys 203 y la Cys 216, y entre la Cys 318 y la Cys 380. En el dominio de VP5 se encuentran las secuencias consenso Asp/Gly/Glu (DGE, entre los aminoácidos 308 a 310) y la secuencia Ile/Asp/Ala (IDA) de unión a integrinas de $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, respectivamente (30). También en VP5 se encuentra una región altamente hidrofóbica (HR) entre los aminoácidos 384 a 401, la cual se ha propuesto que funciona como un péptido de fusión a la membrana celular (43). La espícula de VP4 interacciona con dos moléculas de VP7 en la superficie de la capa externa, y al parecer el dominio globular de VP4 (que se encuentra en VP5) interacciona con seis moléculas de VP6. Se ha propuesto que estas interacciones podrían participar en mantener la correcta geometría entre la segunda y tercera capa (24).

VP7 es una proteína estructural de 326 aa, tiene un peso molecular de 37 kDa y es codificada por el segmento de RNA 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa del rotavirus (Fig. 5). Análisis bioquímicos han determinado que VP7 es una glicoproteína que contiene sólo N-oligosacáridos de alta manosa (4, 34). Durante las reacciones de N-glicosilación, una glucosa₃-manosa₉-N-acetilglucosamina₂ (Glc₃Man₉GlcNAc₂) es transferida del dolicol-fosfato a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica nascente. Para la VP7 intracelular, los residuos de oligosacáridos que se encuentran predominantemente son Man₈GlcNAc₂ y Man₆GlcNAc₂; mientras que el oligosacárido Man₅GlcNAc₂ se encuentra en la VP7 de las partículas virales maduras (34, 35). Un péptido señal que se localiza en el extremo amino terminal de la proteína VP7 la dirige al RE, en donde es modificada cotraduccionalmente siendo glicosilada mientras se va insertando dentro de la membrana del RE. VP7 no se transporta del RE al aparato de Golgi, donde en general se adicionan

azúcares más complejos (35), sino que es retenida en el lumen del RE. En la cepa de rotavirus de simio SA11, la proteína VP7 posee un solo sitio de glicosilación que se encuentra en el aminoácido 69. Otras cepas virales contienen tres sitios potenciales de glicosilación de los cuales aparentemente sólo dos son usados (24).

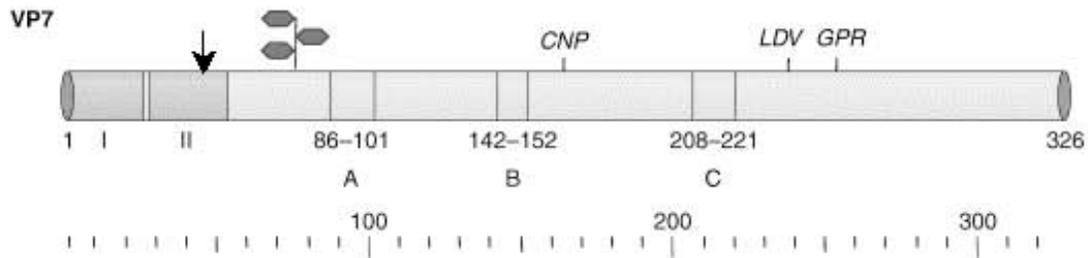


Fig. 5. Esquema de las propiedades estructurales de VP7. Se muestran los dos dominios hidrofóbicos I y II (naranja). Las regiones marcadas como A (aa 86-101), B (142-152) y C (208-221) son epitopes de neutralización (verde). El sitio de procesamiento en el RE (\emptyset). Se muestra la posición de las secuencias LDV y GRP, que son motivos de sitios de unión, a las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha x\beta 2$, respectivamente. Tomada de (39)

Con base en los análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína VP7 de distintas cepas de rotavirus animales y humanos, se han identificado ciertas características con posible relevancia biológica (Fig. 5). El marco abierto de lectura de 326 aminoácidos comienza con un codón de inicio que presenta una secuencia consenso Kozak. Existe también un segundo codón de inicio en fase que se encuentra 30 codones *rio abajo* del primer codón de inicio. Los dos codones de inicio preceden dos regiones hidrofóbicas (HI y HII), que pueden actuar como secuencias señal para dirigir a VP7 hacia el RE. Un tercer codón de inicio en fase se localiza *rio abajo* del segundo dominio hidrofóbico, este codón de inicio se encuentra presente sólo en algunas cepas de rotavirus (54).

La proteína VP7 es procesada por la señalasa en la secuencia del péptido señal entre la Ala-50 y la Gln-51, perdiéndose así los dominios HI (aa 1 a 29) y HII (aa 30 a 50) de la proteína madura (1, 57). De este modo el residuo que se encuentra en el amino terminal de la proteína madura es la glutamina 51.

Muchas proteínas residentes del lumen del RE presentan la secuencia de aminoácidos KDEL (Lys/Asp/Glu/Leu) en el extremo carboxilo, lo que determina su retención en el RE. La proteína VP7 no contiene la secuencia KDEL y hasta ahora no ha sido muy clara la identificación de las regiones de la proteína que le permiten la retención en el lumen del RE. Se han encontrado dos secuencias altamente conservadas que podrían servir para este fin: la secuencia **LPXTGS** (donde X puede ser cualquier aminoácido) localizada entre los aminoácidos 57 y 63 en el extremo amino terminal (24); y la secuencia **MSKRSRS** entre los aminoácidos 292 a 311 en el extremo carboxilo terminal (12). Se ha propuesto que VP7 presenta una orientación luminal, ya que la proteína es protegida cuando microsomas intactos son incubados con tripsina (34). Para que la proteína VP7 se pliegue correctamente, depende de la formación de puentes disulfuro intramoleculares y se observado que se requiere de ATP para que los puentes se formen (47). La estabilidad de la proteína depende del ion Ca^{2+} (20, 63), aunque el sitio de unión a éste aún no se ha localizado directamente. Mediante análisis de secuencia se ha propuesto que se podría ubicar entre los aminoácidos 124 a 155, o bien en dos residuos de prolina (aa 75 y 279) que se encuentran también involucrados en la actividad de unión a calcio (27). En la partícula viral VP7 se encuentra formando trímeros y el calcio es indispensable para la formación de esta estructura. Se ha observado que VP7, NSP4 y VP4 forman heterooligómeros y que el calcio podría ser importante en la oligomerización de estas proteínas en el RE (42, 54-56).

NSP4 es codificada por el segmento 10 del grupo A de rotavirus. Esta proteína de 175 aa con un peso molecular de 28 kDa, presenta tres dominios hidrofóbicos en su extremo amino H1 (aa 7-21), H2 (aa 30-54) y H3 (aa 63-80) (Fig. 6). La proteína contiene dos sitios de N-glicosilación (asparagina 8 y 18) dentro del dominio H1, lo que indica que el extremo amino terminal se encuentra orientado hacia el lumen de RE. Los oligosacaridos

son de alta manosa, cada oligosacárido contiene 8 o 9 manosas y 2 residuos de N-acetilglucosamina. El dominio H2 atraviesa la membrana del RE, exponiendo de esta manera 128 aminoácidos del extremo carboxilo hacia el citoplasma. Se ha sugerido que el segmento corto H3 puede estar asociado con la cara citoplasmática de la membrana del RE.

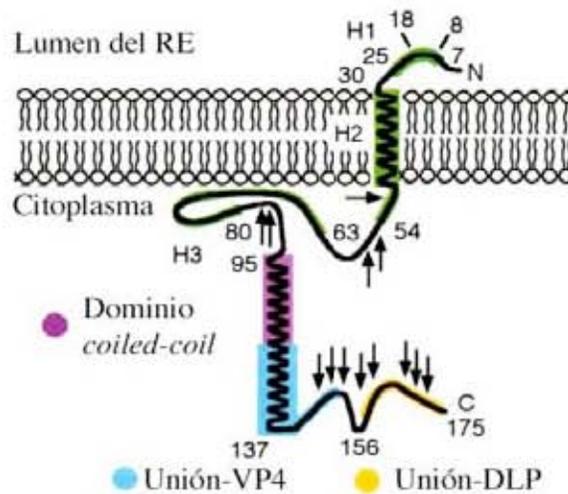


Fig. 6. Representación esquemática que muestra la topología de NSP4 definida por Bergmann *et al* (8). Los dominios hidrofóbicos H1, H2 y H3 se muestran marcados en verde. Dentro del dominio H1 se muestran los sitios de glicosilación 8 y 18. Las flechas indican los sitios susceptibles a proteasas.

La proteína NSP4 al igual que VP7 no presenta el motivo de retención KDEL en su extremo carboxilo terminal y hasta ahora no se sabe cómo es que se retiene en el RE. Se ha encontrado que NSP4 forma oligómeros, probablemente dímeros o tetrameros (42). Entre los residuos 95 a 136 se ha predicho una estructura α -hélice *coiled-coil*, la cual ha sido verificada por análisis cristalográficos de un péptido sintético (aa 95-137) que podría estar mediando la oligomerización de la proteína completa, este análisis también demostró que un sólo ión de Ca^{2+} se encuentra unido al núcleo hidrofílico del dominio *coiled-coil*. Otra región de la proteína que adopta una estructura secundaria helicoidal (aa 55-71) presenta una actividad desestabilizadora de membrana (10, 11, 66, 67). NSP4 presenta un dominio que interactúa con VP4, este dominio se encuentra entre los aminoácidos 112 a 148. NSP4

junto con VP7 y VP4 forman heteroligómeros durante la translocación hacia el RE (42, 54, 55). Se ha sugerido que NSP4 funciona como un receptor intracelular, ya que presenta un dominio de unión a las DLPs en el carboxilo terminal que interacciona directamente con VP6 (6, 66). Al parecer, esta interacción con VP6 media la gemación de las DLPs hacia el interior del RE. Se ha propuesto que durante la morfogénesis viral la glicosilación de NSP4 o de alguna proteína celular es requerida para que la remoción de la membrana de las partículas intermediarias se lleve a cabo (24, 65). Esta proteína también actúa como virotoxina, ya que incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular como parte del mecanismo de muerte celular inducido por la infección con rotavirus (69, 70).

Morfogénesis de Rotavirus

Los rotavirus presentan una ruta morfológica muy particular (Fig. 7). Las DLPs que se ensamblan en los viroplasmos geman hacia el lumen del RE en donde llevan a cabo su maduración, formando partículas infecciosas de tres capas o TLPs. De las 12 proteínas virales que se traducen, dos lo hacen en ribosomas asociados a la membrana del RE, estas son las dos N-glicoproteínas virales VP7 y NSP4.

Como ya se había mencionado, se ha propuesto que VP7 presenta una orientación luminal, mientras que la proteína transmembranal NSP4 presenta el extremo amino terminal orientado hacia el lumen del RE y el extremo carboxilo terminal hacia el citosol (34, 57, 66). El extremo carboxilo de NSP4 presenta dos dominios de unión a las proteínas virales, VP4 y VP6, por lo que se ha sugerido que la gemación de las DLPs hacia el lumen del RE está dada por una interacción entre la proteína VP6 y la proteína no estructural NSP4, que sirve como un receptor intracelular (41, 67-69).

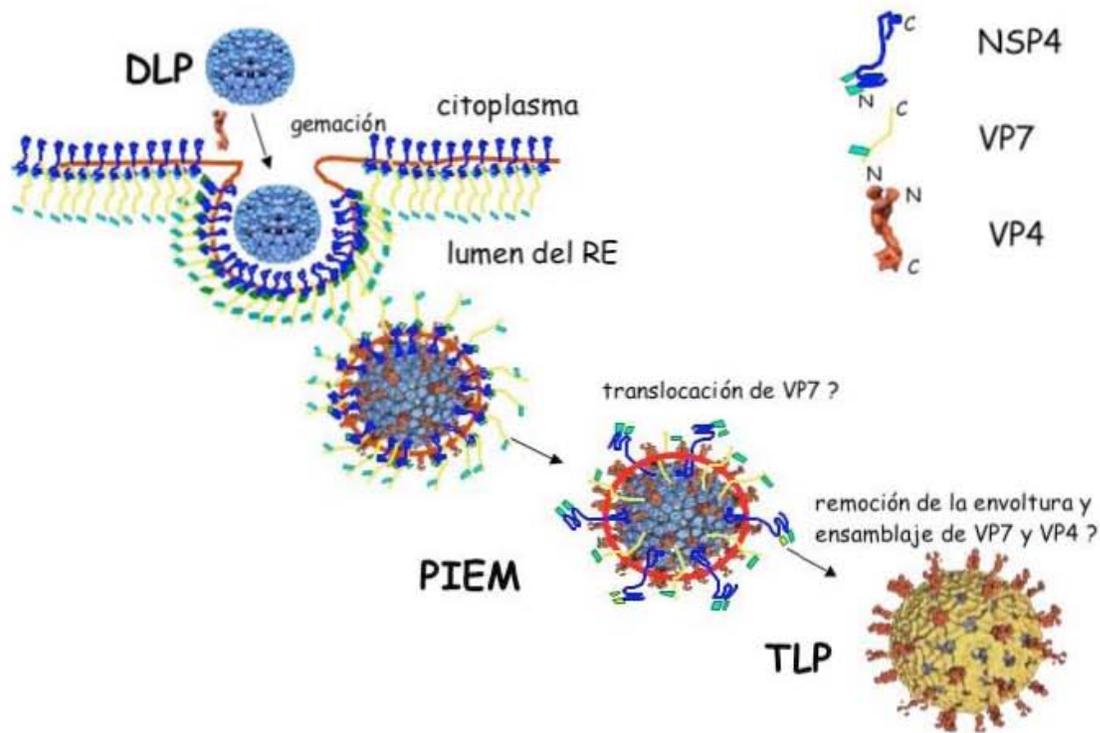


Fig. 7. Representación esquemática del proceso de morfogénesis de rotavirus. La DLP, gema hacia el interior del lumen del RE, a través de una interacción entre VP6 y NSP4. Durante este proceso la DLP adquiere una membrana transitoria junto con las proteínas NSP4, VP4 y VP7, formando la partícula intermediaria envuelta de membrana (PIEM). La proteína VP7 se transloca hacia el interior de la membrana para ensamblarse junto con VP4, la envoltura se remueve y se forma el virion maduro (TLP).

Cuando geman las DLPs adquieren una envoltura lipídica transitoria, visible por microscopia electrónica, en la que se encuentran VP7, NSP4 y posiblemente VP4, formando así a las partículas intermediarias envueltas en membrana (PIEM) (55). En el lumen del RE, esta membrana es eliminada al igual que la proteína NSP4 y el virus adquiere la tercera capa de proteínas formada por VP7 y VP4. El mecanismo por el cual se pierde la envoltura lipídica junto con la proteína NSP4 aún no ha sido descrito, así como tampoco se conoce el mecanismo de ensamblaje de las proteínas VP7 y VP4, que finalmente forman la tercera capa de la TLP. Se ha sugerido que la actividad desestabilizadora de membrana que presentan las proteínas NSP4 y/o VP4, así como la concentración de Ca^{2+} relativamente alta en el lumen del RE, podrían estar implicadas en la

remoción de la envoltura lipídica (19, 45, 56, 68). Se sabe que la remoción del Ca^{2+} intracelular o la prevención de la N-glicosilación de NSP4 por el tratamiento con drogas como la tapsigargina, el ionóforo A23187 o tunicamicina (TM), causan la acumulación de las PIEM dentro del RE (45, 52, 53, 56, 62, 65).

La técnica de RNA de interferencia consiste en el silenciamiento específico de la traducción de una proteína, mediante RNAs pequeños (21 nt) de doble cadena (siRNAs), que dirigen la degradación específica del RNA mensajero con el cual tienen 100 % de identidad (22). Utilizando esta técnica, estudios realizados en el laboratorio han demostrado que el heteroligómero conformado por VP7, VP4 y NSP4 no parece ser de importancia para la gemación de las DLPs, ya que la inhibición de la expresión de la proteína VP4 mediante siRNAs, demuestra que la presencia de esta proteína en el heteroligómero no es necesaria para que las DLPs gemen hacia el RE. Tampoco lo es para que la proteína VP7 se ensamble o para que se elimine la envoltura lipídica, ya que en ausencia de VP4 se forman partículas glabras o “spikeless TLPs”, donde la capa externa sólo está formada por la proteína VP7 (16). De la misma manera se ha encontrado que, la inhibición de la expresión de la proteína VP7 no impide que las DLPs gemen hacia el RE, pero sí que pierdan la envoltura lipídica, ya que en ausencia de VP7 se observa una gran acumulación de PIEM en el lumen del RE. Estas partículas son muy similares a las que se observan al microscopio electrónico, cuando las células infectadas son tratadas con drogas como tunicamicina y tapsigargina. Estos resultados indican que la proteína NSP4, y no el heteroligómero de VP7/VP4/NSP4, es suficiente para que las DLPs gemen al lumen del RE y que VP7 durante la morfogénesis viral, está implicada en la remoción de la envoltura lipídica transitoria (41, 76). Con la finalidad de analizar bioquímicamente cómo es que están conformadas las PIEM y poder

estudiar con más detalle el proceso de remoción de la envoltura lipídica transitoria, nos propusimos purificar las PIEM que se producen al inhibir la expresión de VP7 mediante siRNAs o al inhibir la N-glicosilación con TM.

Objetivo

Purificar partículas intermediarias envueltas de membrana y:

- Analizar su composición de proteínas virales
- La topología de las proteínas virales que las conforman.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y virus

Se utilizó la línea celular MA104, derivada de células epiteliales de riñón de mono *Rhesus*. Las células se crecieron en medio mínimo esencial de Eagle (DMEM, Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), a 37 °C y en un ambiente húmedo, con 5% de CO₂.

La cepa de rotavirus de mono *Rhesus* RRV fue originalmente donada por H.B. Greenberg de la Universidad de Stanford, California, y la cepa de rotavirus de simio SA11 clona 28 fue donada por Mary Estes del Baylor College of Medicine, Texas.

siRNAs

La secuencia de los siRNAs utilizados en este trabajo se encuentran reportadas en López *et al* (41). El siRNA del gen de VP7 de RRV corresponde a los nucleótidos 650 a 671 (siRNA-VP7). Los siRNAs de LamA/C (control) y de VP7 fueron producidos por la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA).

Transfección de los siRNAs

Monocapas de células MA104 crecidas en frascos de 25 cm² fueron transfectadas con los siRNAs control o VP7, de la siguiente manera. Se mezcló 2µl de lipofectamina por cada 100µl de siRNAs (control o VP7) a 600 pmol/ml en MEM sin antibióticos. A cada frasco se le agregó 1 ml de la mezcla, las células fueron previamente lavadas con MEM y se incubó por 8 hrs a 37 °C. Los frascos se movieron lentamente cada 15 min durante el

tiempo de lipofección. Posteriormente se le agregó a cada frasco 3 ml de MEM, y se mantuvieron en este medio a 37 °C por 48 hrs, antes de ser infectadas con RRV.

Inhibición de la N-glicosilación con Tunicamicina (TM).

Monocapas de células MA104 crecidas en frascos de 160 cm² fueron infectadas con las cepas de rotavirus RRV o SA11(28), como se describió anteriormente. Una hora post-infección se agregó la TM (Sigma) a una concentración de 2.5 µg/ml en MEM y se mantuvo hasta las 8 hrs, tiempo al cual las células fueron cosechadas.

Gradientes discontinuos de Optiprep (Iodixanol).

Las monocapas de células infectadas se recuperaron con gendarme, se colocaron en tubos falcon de 15 ml, se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm en la centrífuga Beckman modelo TJ-6, se decantó el sobrenadante, y la pastilla celular se resuspendió en la solución A (HEPES 50 mM pH 7.4, sacarosa 250 mM), se dejó reposar por 10 min y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, se realizaron dos lavados, centrifugando en cada lavado como se describió anteriormente. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 500 µl de la solución A y las células se homogenizaron (Tissue grinder 4 ml, Thomas Scientific) dando 50 golpes a un nivel medio del homogenizador (TRI-R Instruments, model K41). El homogenizado celular se centrifugó por 10 min a 1500 rpm a 4 °C en tubos eppendorf (centrífuga Hettich rotor 1620A), con la finalidad de precipitar los núcleos y las células no rotas. El sobrenadante se recuperó, se llevó a un volumen de 400 µl con la solución A y se mezcló con 800 µl de optiprep (Axis-Shield) al 60 % para dar un volumen de 1.2 ml a una concentración final de optiprep al 40 %, la mezcla se colocó en el fondo de un tubo (Beckman) y posteriormente se le añadieron las siguientes capas de optiprep: 1.8 ml de

optiprep al 35 %, 1 ml al 30 % y 1 ml al 5 %. El optiprep se diluyó con la solución A. Este gradiente preformado se centrifugó durante 4 hrs a 45,000 rpm sin freno en el SW50.1 a 4 °C, posteriormente se colectaron 14 fracciones de 355 µl desde arriba del gradiente y se guardaron a 4 °C. El contenido de proteínas de cada fracción se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10 o al 12.5 %.

Tratamientos de las fracciones de los gradientes.

Las fracciones colectadas fueron tratadas o no con Tritón X-100 (Sigma) al 1% en Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM por 30 min a 37 °C, posteriormente se incubaron o no con 100 µg/ml tripsina (Sigma) por 30 min a 37 °C. La tripsina se inactivó con 200 ng/ml de Aprotinina (Sigma).

Después de cada tratamiento las muestras se sedimentaron en un colchón de sacarosa al 45 % en Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM. La muestra se colocó sobre 4 ml de sacarosa al 45 %, y se centrifugó durante 70 min a 40,000 rpm en el SW50.1 a 4 °C. Finalmente se retiró la sacarosa y la pastilla resultante se resuspendió en solución de lisis. El contenido de proteínas de cada partícula se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Marcaje Metabólico de Proteínas.

Monocapas de células MA104 fueron infectadas a una moi de 3 con RRV, como se describió anteriormente. A las 3.5 hpi se les retiró el medio y se dejaron en MEM sin metionina por 30 min a 37 °C, posteriormente se añadió MEM con 50 µCi/ml de [³⁵S]-metionina (Dupont NEN) durante 4 horas, para marcar radioactivamente a las proteínas.

Las células se cosecharon para hacer gradientes discontinuos de optiprep, como se describió anteriormente.

La incorporación de ^{35}S de cada fracción se contó por duplicado, una alícuota de cada fracción se colocó en papel filtro y se dejó secar, posteriormente los papeles se lavaron con TCA al 20 % por 20 min, dos veces con TCA 5 % por 10 min, y finalmente se lavaron en etanol absoluto por 5 min y se dejaron secar. Cada papel se colocó en viales con 3 ml de líquido de centelleo (EcoLite, ICN), la radioactividad incorporada se detectó en el contador de centelleo (Beckman).

Western Blot

A) Electroforesis

Diez microlitros de cada fracción, o la pastilla de cada colchón de sacarosa, se resuspendieron en solución de lisis (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2 % SDS, 0.1 % azul de bromofenol, 10 % glicerol, 1 % b-mercaptoetanol) y se analizaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10, 12.5 o 15 % en amortiguador Tris-Glicina. Las muestras se separaron a 100 Volts en el gel concentrador y a 150 Volts en el gel separador.

B) Electrotransferencia, e inmunotinción

El gel de proteínas (ver arriba) se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, a 50 Volts durante 1 hr en amortiguador CAPS (10 mM –ciclohexilamino-1-ácido propanesulfónico-pH 11) en metanol al 10 %. Para verificar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau S (0.1 % Ponceau, en 5 % de ácido acético), se lavó varias veces hasta que se destiñó y se bloqueó con leche descremada en polvo al 5 % en PBS (por 1 hr en agitación a Temperatura Ambiente). Posteriormente, la membrana se incubó por 1 hr en

agitación a TA con los anticuerpos primarios α -NSP4 1:1000 (anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína NSP4), α -rotavirus 1:3000 (anticuerpo policlonal de conejo contra las proteínas estructurales del virus) o el Mab HS2 1:1000 (anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína VP5), diluidos en 1 % de leche en PBS. La membrana se lavó tres veces por 10 minutos con PBS- Tween 0.1 % y se incubó con el segundo anticuerpo usando una dilución 1:3000 en 1 % de leche en PBS, del anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Kikegaard & Perry Laboratories Inc. KPL) o anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa por 1 hr a 37 °C. Finalmente, la membrana se lavó tres veces por 10 minutos con PBS-Tween 0.1 % y la detección de las proteínas se realizó con el sustrato luminol (Perkin Elmer), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados y Discusión

Con el objetivo de purificar partículas intermediarias envueltas en membrana (PIEM), se comenzó por estandarizar una técnica que nos permitió separar a estas PIEM de las partículas virales sin membrana. Para cumplir con este objetivo se hicieron gradientes discontinuos de Optiprep, ya que en esta solución se han podido aislar virus con membrana, a diferencia de la purificación convencional con CsCl. Además, este reactivo permite que los componentes que presentan lípidos floten, como, por ejemplo, los microdominios lipídicos de la membrana (Rafts) (49).

Para incrementar la cantidad relativa de PIEM en el RE, inicialmente las células infectadas se trataron con la droga TM como control. Como ya se había mencionado, esta droga inhibe la N-glicosilación y tiene un efecto similar al que se observa, por microscopia electrónica, cuando se inhibe la expresión de la proteína VP7 mediante siRNAs. Bajo estas dos condiciones, la morfogénesis del virus se detiene en el estadio de PIEM dentro del lumen del RE, lo que impide que se formen los viriones maduros (TLPs).

La distribución de las proteínas virales en el gradiente cambia cuando las células infectadas son tratadas con TM.

Cuando se fracciona un lisado celular proveniente de una infección control en un gradiente de 5–40% de optiprep, se observa que la proteína viral se acumula principalmente en dos fracciones del gradiente: la fracción del fondo del gradiente (aproximadamente 40 %) que es la fracción soluble, en donde se acumulan mayoritariamente las proteínas virales, y en la fracción de 30 % donde se observa muy poca proteína viral. En contraste, cuando las células infectadas fueron tratadas con TM, la mayor parte de la proteína viral se

acumuló en la fracción membranal (30 % de optiprep) y se observó muy poca proteína viral en la fracción soluble (Fig. 8). Además, en estos geles se pueden observar las formas no glicosiladas de las proteína VP7 y NSP4, indicando que la TM inhibió la glicosilación de estas proteínas.

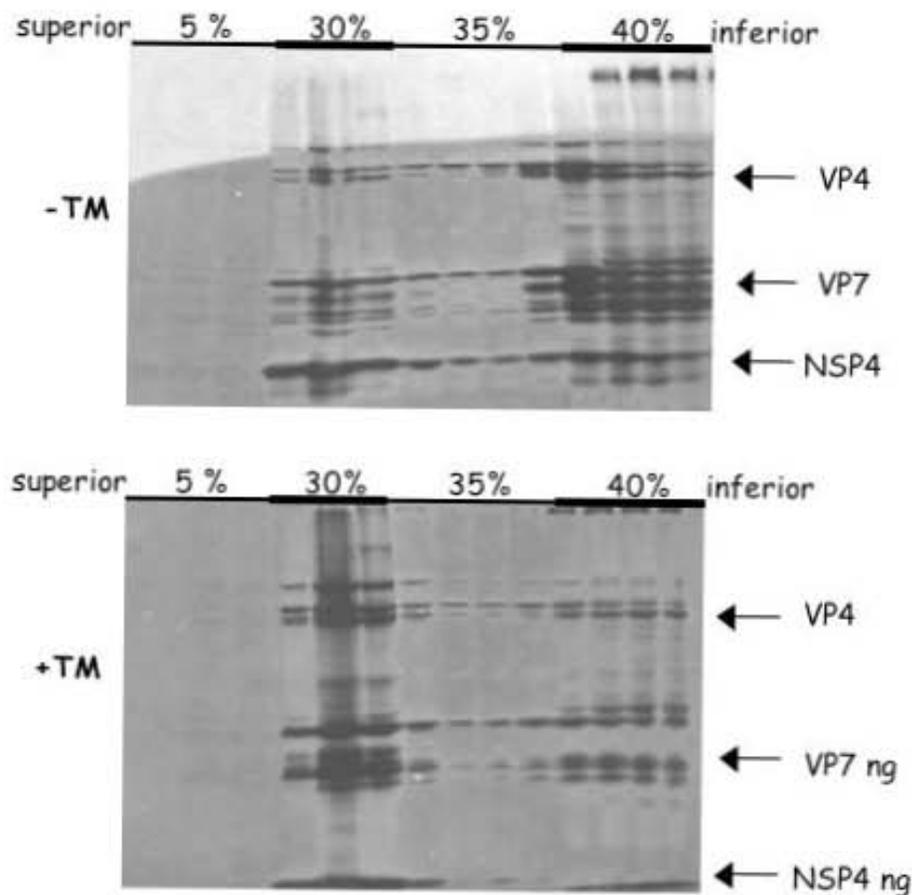


Fig. 8. Distribución de las proteínas virales en un gradiente discontinuo de optiprep en presencia o ausencia de tunicamicina (TM). Células MA104 se infectaron con RRV a una moi de 3, 4 hpi las proteínas se marcaron radioactivamente con ^{35}S (50 $\mu\text{Ci/ml}$), y a las 8 hpi las células se cosecharon. Estos lisados se utilizaron para hacer un gradiente discontinuo (5-40%) de optiprep. Las células fueron tratadas (+TM) o no (-TM) con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina que se agregó 1 hpi y se mantuvo en el medio hasta las 8 hpi. Autoradiografía (gel de poliacrilamida al 10%) de cada gradiente, del cual se tomaron 14 fracciones. Arriba de cada gel se muestra el porcentaje de optiprep. ng=no glicosilada.

Este cambio en la proporción de proteínas virales en los gradientes, sugiere que cuando las células infectadas son tratadas con TM, las PIEM se acumulan en las fracciones membranales. Probablemente en estas condiciones las DLPs gemaron hacia lumen de RE

entrando a su estadio de PIEM, pero al inhibir la N-glicosilación estas partículas no pudieron perder la membrana y se acumularon en el lumen del RE.

Para demostrar de manera cuantitativa que la distribución de las proteínas virales en los gradientes cambia cuando las células infectadas son tratadas con TM y que las PIEM se acumulan en la fracción membranal del gradiente, cuantificamos la incorporación total de marca (^{35}S) del lisado celular antes de fraccionarlo en el gradiente y también se cuantificó la marca presente en cada fracción del gradiente después de colectarlo. Posteriormente, el total de incorporación de ^{35}S del gradiente se comparó con respecto a la marca incorporada en cada una de las fracciones de cada gradiente.

La Tabla 2 muestra que el gradiente de las células infectadas tratadas con TM contiene más proteína marcada con ^{35}S en la fracción membranal (40 %) que en la fracción soluble (22 %), a diferencia de lo que se encontró en una infección normal, en la que las proporciones de proteínas encontradas fueron 15 % y 30 %, respectivamente, lo que sugiere que en una infección normal la mayoría del virus maduro se encuentra en la fracción soluble. Para apreciar el incremento o disminución de las proteínas virales en las fracciones soluble o membranal de las células infectadas que fueron tratadas con TM, tomamos como 100 % al porcentaje de incorporación de ^{35}S de las fracciones del gradiente obtenidas durante una infección normal y lo comparamos con el de las tratadas con TM. Lo que observamos fue que la proteína se acumula en un 78 % más en la fracción membranal y disminuye en un 50 % en la fracción soluble, cuando las células infectadas fueron tratadas con TM. Estos datos apoyan la idea de que las PIEM se acumulan en el lumen del RE (fracción membranal) debido a que no se forman partículas maduras, lo cual se ve reflejado en la disminución de proteína en la fracción soluble cuando las células infectadas son tratadas con TM.

Tabla 2. La inhibición de la N-glicosilación con TM, incrementa la cantidad de proteínas virales en la fracción de membrana (MT).

Fracción		% (a)	% (b)
Soluble	Control	30 (± 7.2)	100
	Tunicamicina	15 (± 3.7)	51
Membranal	Control	22 (± 4.8)	100
	Tunicamicina	40 (± 0.6)	178

a Datos expresados como el porcentaje de incorporación de ^{35}S en cada fracción del gradiente
b Mismos datos expresados como el porcentaje de su respectivo control.

Se ha observado que cuando la célula se encuentra bajo un estrés del RE (provocado con drogas, como por ejemplo la TM), la traducción de las proteínas es inhibida temporalmente. Esto es debido a que la cinasa PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) se oligomeriza y se autofosforila, lo que resulta en la fosforilación de la serina 51 del factor de inicio de la traducción eIF2 α , inhibiendo así el inicio de la traducción (37, 50). Además, durante el estrés, muchas de las proteínas no se pliegan correctamente, lo cual enciende una respuesta llamada ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation), donde las proteínas mal plegadas son transportadas desde el RE hacia el citoplasma, donde son ubiquitinadas y degradadas en el proteasoma (37, 50, 71). Cabe señalar que el efecto de la tunicamicina durante la infección, también reduce el porcentaje de la incorporación de marca radioactiva (4, 53, 65). En este trabajo encontramos que la incorporación de ^{35}S disminuyó en aproximadamente un 30 % respecto a la marca incorporada durante una infección normal (datos no mostrados), lo cual podría explicarse por la respuesta al estrés del RE antes mencionada .

Calnexina sólo se encuentra presente en las fracciones de membrana.

Para demostrar que uno de los tipos de membrana contenida en las fracciones membranales proviene del RE, buscamos proteínas marcadoras específicas de este

organelo. En este ensayo se corrieron las fracciones del gradiente en SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con anticuerpos dirigidos contra la proteína calnexina (91 KDa), la cual es una lectina tipo chaperona que reside en la membrana del RE. En este ensayo, encontramos que esta proteína sólo está presente en las fracciones membranales y no en las fracciones solubles (Fig. 9).

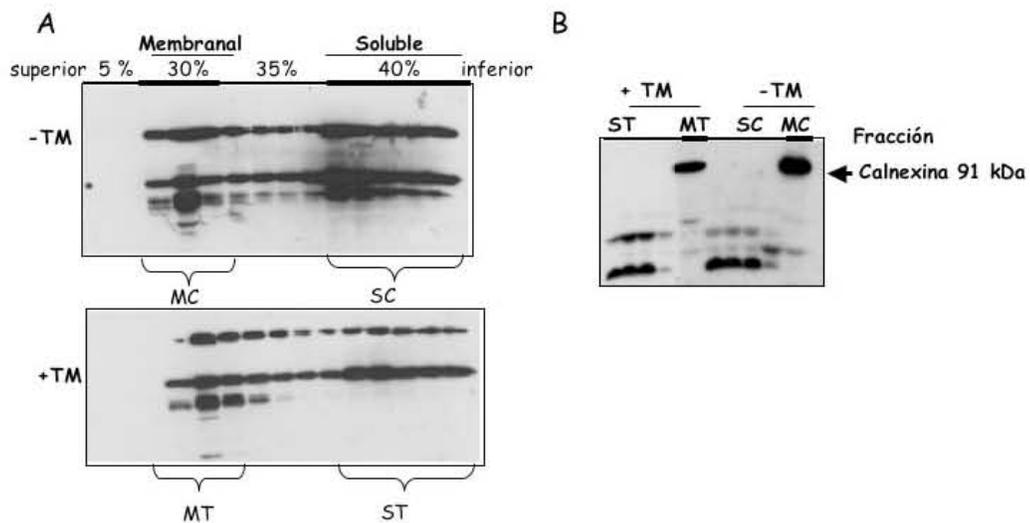


Fig. 9. La calnexina sólo se encontró en las fracciones de membrana. A). Western blot utilizando el anticuerpo α -rotavirus (detecta a las proteínas virales) que muestran la distribución de las proteínas virales y la selección de las fracciones solubles y de membrana. B) Western blot utilizando el anticuerpo α -calnexina. MC (fracción membranal) y SC (fracción soluble) de células infectadas control. MT (fracción membranal) y ST (fracción soluble) de células infectadas tratadas con TM.

Estructura y topología de las proteínas virales en las PIEMs

Nuestro segundo objetivo fue el caracterizar cuáles son las proteínas virales que conforman las PIEM y cuál es la topología de estas proteínas en la partícula envuelta.

Con base en los antecedentes que se tienen de la orientación que presentan las proteínas virales VP7 y NSP4, en la membrana del RE (Fig. 7), nosotros proponemos que la topología de estas proteínas en la PIEM podría ser la siguiente: como se mencionó, NSP4 es una proteína transmembranal cuyo extremo amino terminal está orientado hacia el lumen del RE y su extremo carboxilo terminal se encuentra orientado hacia el citoplasma. En este

extremo se encuentra el dominio de unión a las DLPs que les permite gemar hacia el interior del lumen del RE, por lo que suponemos que el carboxilo terminal de NSP4 debería de estar al interior de la envoltura de la PIEM, exponiendo así sólo su extremo amino terminal. Por otra parte, dado que VP7 presenta una orientación principalmente luminal, esta proteína debería encontrarse por fuera de la envoltura de la PIEM. Finalmente, la proteína VP4 se encuentra en el citoplasma, y se sabe que interacciona con un dominio presente en el extremo carboxilo de la proteína NSP4, por lo que suponemos que la proteína VP4 gema junto con la DLP hacia el lumen de RE y que se encontraría mayoritariamente por dentro de la envoltura de la PIEM.

Para determinar si las interacciones de estas proteínas (VP4, VP7 y NSP4) en la PIEM dependen de su asociación directa con la envoltura lipídica o de una interacción entre proteínas, tratamos a las PIEM con Tritón X-100. Este detergente no iónico se usa para solubilizar los lípidos, lo que causa que las proteínas que se encuentran asociadas a membrana se liberen. Por otra parte, para observar cuales de estas proteínas se encuentran expuestas hacia el exterior de la PIEM, tratamos a estas partículas con tripsina, que es una proteasa que corta las argininas y lisinas susceptibles en las proteínas, lo cual depende de la estructura tridimensional de la proteína.

Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: cada fracción colectada del gradiente se trató o no con Tritón X-100 y posteriormente también estas fracciones se trataron o no con tripsina (ver materiales y métodos). Al término de cada tratamiento, las fracciones se sedimentaron a través de un colchón de sacarosa al 45 %, lo que permite separar los complejos proteicos de la proteína soluble, ya que la proteína que se encuentre soluble no puede sedimentar a través de la sacarosa y así sólo se precipitan las proteínas que se encuentran formando partículas. Finalmente, la pastilla resultante de esta

centrifugación se resuspendió en solución de lisis y se analizó el contenido de proteínas por western blot.

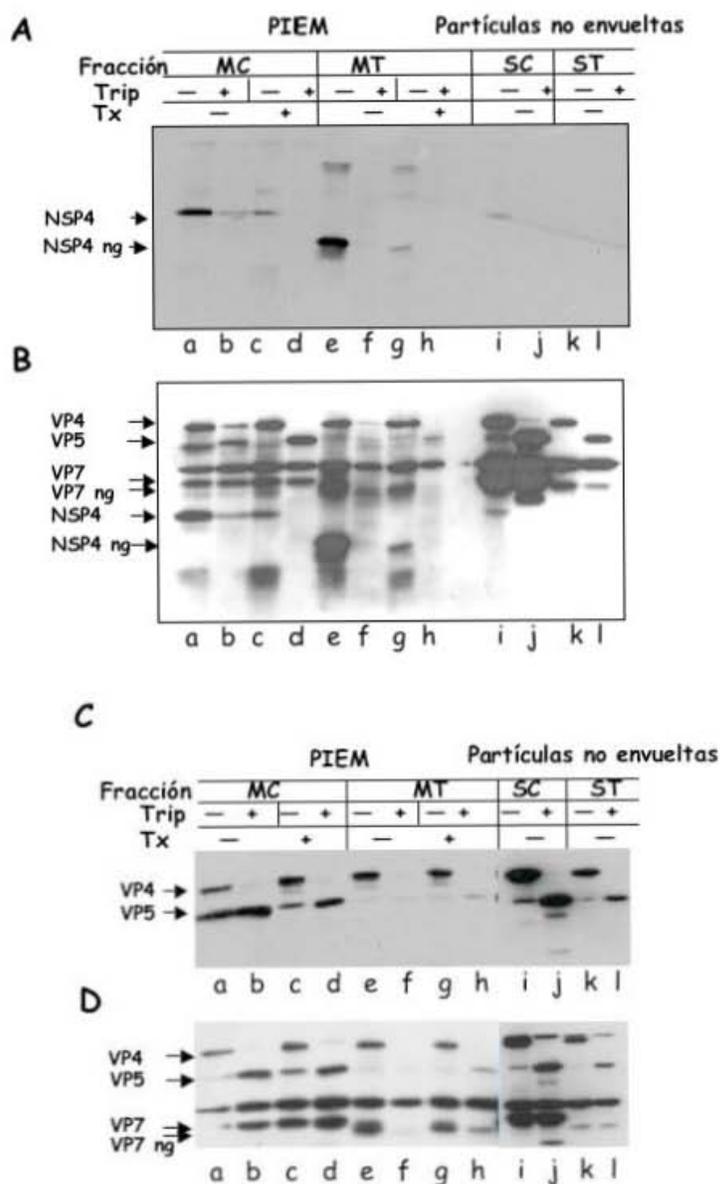


Fig. 10. Distribución de las proteínas que conforman las partículas virales de RRV en las fracciones soluble y membranal. Las fracciones soluble y membranal del gradiente se trataron o no con Tritón X-100 y posteriormente se trataron o no con tripsina. Al término del tratamiento las muestras se sedimentaron a través de un colchón de sacarosa, las pastillas resultantes se resuspendieron en solución de lisis, y el contenido de proteínas virales se analizó por SDS-PAGE al 15 % y al 10 %, (A,B y C,D, respectivamente). A) Western blot utilizando α -NSP4, B) posteriormente la misma membrana se incubó con el α -rotavirus para revelar a las proteínas estructurales. C) Western blot utilizando el Mab HS2 que reconoce a las proteínas virales VP4 y VP5, D) la misma membrana se incubó posteriormente con el α -rotavirus para revelar a las proteínas estructurales. MC (fracción membranal) y SC (fracción soluble) de células infectadas control. MT (fracción membranal) y ST (fracción soluble) de células infectadas tratadas con TM. Cada carril representa el resultado de un colchón de sacarosa denotado con una letra (a-l), que explica cada tratamiento.

Como era de esperarse, las PIEM obtenidas de una infección control contienen las proteínas estructurales que conforman las DLPs (VP1, VP2, VP3 y VP6) más las proteínas de la tercera capa, VP4 y VP7, además de la proteína no estructural NSP4 (Fig. 10. **A-D**, carril **a**). Las PIEM tratadas con TM contienen las mismas proteínas que las PIEM control, pero las proteínas VP7 y NSP4 no se encuentran glicosiladas, debido a que la TM inhibe el primer paso del proceso de glicosilación (Fig. 10. **A-D**, carril **e**). Las partículas que se encuentran en las fracciones solubles de ambos tratamientos (control y TM), sólo presentan a las proteínas estructurales y no se detecta la presencia de NSP4 (Fig. 10. **C** y **D**, carriles **i** y **k**).

La proteína NSP4 se pierde al solubilizar la membrana con Tritón X-100.

Cuando las PIEM (tratadas con TM o no) se trataron con Tritón X-100 y posteriormente estas partículas se centrifugaron sobre un colchón de sacarosa, la proteína NSP4 dejó de formar parte de las PIEM (Fig. 10. **A**, carriles **c** y **g**). Como se mencionó anteriormente, el Tritón X-100 es un detergente que solubiliza los lípidos y debido a que NSP4 es una proteína transmembranal, este resultado sugiere que NSP4 esta asociada a las PIEM solamente a través de su interacción con la membrana lipídica. Se sabe que NSP4 interacciona también con las proteínas VP6, VP7 y VP4 (6, 42, 54, 55, 66); sin embargo, estos resultados sugieren que estas interacciones no son lo suficientemente fuertes para que NSP4 se mantenga unida a la partícula viral al tratarla con el detergente. También, en la Fig. 10 (**B-D**, carriles **a** y **c**), se puede observar que las proteínas VP4 y VP7 se mantienen asociadas a las PIEM independientemente del tratamiento con Tritón X-100, lo que sugiere que estas proteínas no sólo interaccionan con la partícula a través de la membrana lipídica. De hecho, se ha demostrado que VP4 interacciona directamente con VP6, ya que al producir y purificar VLPs (virus-like particles), que co-expresan las proteínas VP2/4/6 en el

sistema baculovirus-recombinante-células de insecto (14), la proteína VP4 se ensambla en la partícula aún en ausencia de la capa más externa que esta formada por VP7. Además, se ha descrito que el dominio globular de VP4 (que se encuentra en VP5) interacciona directamente con seis moléculas de VP6 (24). En el caso de la glicoproteína VP7, se ha demostrado que ésta también interacciona directamente con VP6 (21, 24). En las partículas provenientes de las fracciones solubles (control o tratadas con TM), ninguna de las proteínas estructurales se pierde con el tratamiento de Tritón X-100 (datos no mostrados).

Como ya se había mencionado, cuando las TLPs son tratadas con tripsina la única proteína susceptible es VP4, lo que da lugar a dos polipéptidos: VP8 de 28 kDa y VP5 de 60 kDa. Este corte proteolítico es importante para incrementar la infectividad del virus (5, 28, 40). Cuando las PIEM obtenidas de una infección control se trataron con tripsina, sólo las proteínas NSP4 y VP4 fueron susceptibles a esta proteasa (Fig. 10. **A-D**, carriles **b** y **d**). En el Western blot de este ensayo, utilizando el anticuerpo Mab HS2 que reconoce a las proteínas VP5 y VP4, se observa preferencialmente a la proteína VP5 y un poco de la proteína VP4 (Fig. 10 **C**). Cuando las PIEM obtenidas de una infección control se trataron previamente con Tritón X-100 y después con tripsina, se observó un incremento en el corte (ya que solo se detectó la presencia de VP5), esto puede ser debido a que al remover la envoltura lipídica la mayor parte de la proteína VP4 se encuentre más expuesta a la tripsina (Fig. 10. **C**, carril **d**).

El hecho de que aún sin remover la capa lipídica con el tratamiento de Tritón X-100, la proteína VP4 pueda ser cortada con tripsina en VP5 y VP8 (Fig. 10. **C**, carril **b**), sugiere que la proteína VP4 podría estar atravesando la envoltura lipídica y se encuentre expuesta. Se sabe que la proteína VP4 posee una región altamente hidrofóbica en VP5 (la región HR entre los residuos 384 a 401), la cual se ha propuesto que funciona como un

péptido de fusión a la membrana celular (44). Es probable que esta región hidrofóbica sea la responsable de que VP4 atraviese la envoltura lipídica y se exponga el sitio susceptible a la tripsina, aunque sería necesario hacer experimentos de mutagénesis dirigida para demostrarlo directamente.

En el caso de NSP4, cuando las PIEM (obtenidas de una infección control) fueron tratadas con tripsina, esta proteína no se observa en el Western blot (Fig. 10. **A**, carril **b** y **d**). En la figura 11, se muestra una representación esquemática de NSP4 en la que se señalan los sitios susceptibles al corte con tripsina, tanto del extremo que se expone hacia el citoplasma (carboxilo terminal), como del que se expone hacia el lumen del RE (amino terminal). Como ya se había mencionado, el sitio de interacción con la DLP se encuentra en el carboxilo terminal, lo que implica que cuando las DLPs geman hacia el lumen del RE, el extremo N-terminal es el que quedaría expuesto al corte con tripsina, pero en este extremo sólo se encuentra un posible sitio susceptible, el cual de ser cortado casi no afectaría el peso de la proteína, de aproximadamente 27 kDa (Fig. 6, 7 y 11). Sin embargo, en los resultados del Western blot, la proteína NSP4 no se observa (Fig. 10. **A**, carril **b**), lo que podría ser debido a que la proteína tal vez se transloque hacia el interior de la PIEM después de haber funcionado como receptor en la membrana del RE. De ser así, se expondrían los sitios de corte que se encuentran en el extremo carboxilo terminal. Si este fuera el caso, se esperaría encontrar una proteína aproximadamente de 14 kDa (Fig. 10. **A**, carril **b**), la cual no se observa en nuestros experimentos, lo que sugiere que la proteína o es totalmente degradada (poco probable, debido a que no hay mas sitios susceptibles) o que el anticuerpo que se utilizó en estos Western blots no reconoce bien el fragmento resultante de esta digestión en este ensayo.

Para demostrar cuál es la topología de NSP4 en la PIEM, se tendrían que realizar ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos con especificidad hacia el extremo N-terminal o el C-terminal, y también ensayos con la enzima endoglicosidasa H que corta específicamente los azúcares de alta manosa, lo que nos permitirá caracterizar cuál de los dos extremos de esta proteína es el que se encuentra expuesto, por fuera de la envoltura lipídica. Con base en los antecedentes ya mencionados, que se tienen de la orientación de esta proteína en la membrana del RE, el fragmento expuesto debería de ser el N-terminal (extremo donde se encuentra la glicosilación) (ver Fig. 7).

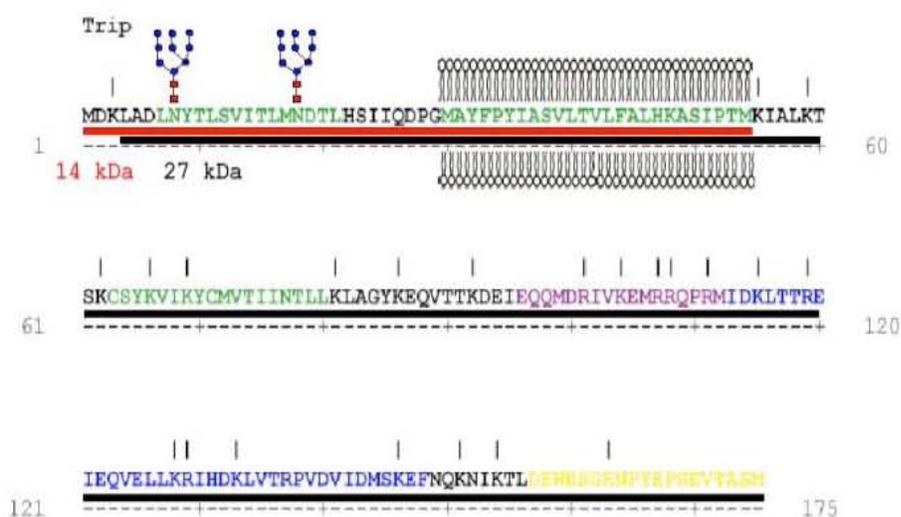


Fig. 11. Representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de NSP4, donde se muestran los sitios susceptibles a la tripsina a partir de la secuencia primaria. Para la predicción de los sitios susceptibles a la tripsina se utilizó el programa <http://www.expasy.org/tools/peptidecutter>. Los sitios reconocidos por tripsina se encuentran indicados con una línea vertical. La predicción de la masa molecular se obtuvo utilizando el programa <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. Solo se marcan los dos péptidos que podrían distinguirse en el western blot después de tratar a las PIEM con tripsina; uno de 14 kDa (línea naranja) y uno de 27 kDa (línea negra). Se ilustra los sitios de glicosilación (asparagina (N) 8 y 18) y el dominio hidrofóbico H2 (aa 30 a 54), que es el que atraviesa la membrana del RE.

Por otro lado, de acuerdo a caracterizaciones previas, VP7 es una proteína que presenta una orientación totalmente luminal en la célula (34) (ver Fig. 7). Cuando las DLPs geman hacia el lumen del RE, se esperaría que VP7 estuviera localizada por fuera de la envoltura de las PIEM. Pero debido a que ésta es la proteína que forma la superficie lisa de

la tercera capa, se ha propuesto que existe un evento de translocación de VP7 hacia el interior de la envoltura, para que así pueda ensamblarse junto con VP4, que forma los *spikes* de la tercera capa, y formar el virión maduro (TLP) (Fig. 7) (24, 55). Cuando se trataron a las PIEM obtenidas de una infección control con tripsina, independientemente de si fueron o no tratadas con Tritón X-100, se observó que la proteína no fue susceptible al corte por tripsina (Fig. 10. **B-D**, carriles **b** y **d**). Esto puede ser debido a que los sitios susceptibles al corte sean protegidos por los azúcares o por el tipo de plegamiento de esta proteína. Aún se desconoce cómo es que VP7 es retenida en el RE, pero el hecho de que al tratar a las PIEMs con Tritón X-100 esta proteína no se pierde, sugiere que además de sus interacciones con la membrana del RE, tiene otras interacciones proteína-proteína con la partícula viral. Lo que indica también es que muy probablemente existe un evento de translocación de VP7 hacia el interior de la envoltura, en donde puede interaccionar directamente con VP6 y VP4.

Como ya se había mencionado, las PIEM obtenidas de células infectadas tratadas con TM, presentaron las mismas proteínas que las PIEM obtenidas de una infección control, sólo que las proteínas VP7 y NSP4 no se encontraron glicosiladas (Fig. 10. **A** y **D**, carril **e**). Cuando estas PIEM fueron tratadas con Tritón X-100, se encontró, al igual que lo que se había encontrado en el tratamiento de las PIEM control, que la proteína NSP4 se perdió junto con la envoltura lipídica, (Fig. 10. **A**, carril **g**). El tratamiento de las PIEM (obtenidas de células infectadas tratadas con TM) con tripsina, tratadas o no previamente con Tritón, resultó en la degradación total de las proteínas VP7 y VP4 (Fig. 10. **B-D**, carriles **f** y **h**).

Estos resultados indican que la proteína VP7, ya sea glicosilada o no, permanece asociada a la partícula viral, pero ésta es susceptible a la proteólisis con tripsina cuando se

inhibe la glicosilación, lo que sugiere que la proteína no sé esta plegando de manera correcta o al no contener los azúcares se exponen sitios susceptibles al corte por tripsina y por eso es digerida. Esta susceptibilidad existe aún y cuando no se realiza el tratamiento con Tritón X-100, lo que implica que muy posiblemente ésta se encuentra expuesta hacia la parte exterior atravesando la envoltura de la PIEM.

Para estudiar si es que los azúcares presentes en VP7 son capaces, o no, de protegerla de la digestión por tripsina, decidimos aislar y caracterizar las PIEM producidas durante una infección normal o en presencia de TM, de una variante de la cepa de simio SA11, denominada SA11(28) cuya VP7 no está glicosilada normalmente y a pesar de esto es infecciosa.

Cuando tratamos a las PIEM obtenidas de una infección control de SA11 (28) con tripsina, encontramos que la proteína VP7 no fue susceptible a la digestión, aún y cuando se removi6 la envoltura de la PIEM con Trit6n X-100 (Fig. 12. **B** y **C**, carriles **b** y **d**). Las 6nicas prote6nas susceptibles a la digesti6n por la tripsina fueron VP4 y NSP4 (Fig. 12. **A-C**, carriles **b** y **d**). Estos resultados fueron iguales a los que se obtuvieron cuando las PIEM control de la cepa RRV se trataron con tripsina y Trit6n X-100. Lo cual demuestra, que los carbohidratos no son los responsables de proteger a la prote6na VP7 del corte con tripsina, ya que a6n en ausencia de la envoltura de la PIEM, la VP7 (no glicosilada) que permanece asociada a la part6cula viral, no fue susceptible a esta proteasa (Fig. 12. **C** y **B**, carril **d**). En contraste, en las PIEM de SA11(28) obtenidas de c6lulas infectadas tratadas con TM, las prote6nas VP7 y VP4 son digeridas por la tripsina, al igual que en las PIEM de RRV tratadas con TM (Fig. 12 y Fig. 10. **A-D**, carriles **f** y **h**). Estos resultados sugieren, que al inhibir la glicosilaci6n con TM las prote6nas VP7 y VP4 no se pliegan correctamente,

provocando que se vuelvan susceptibles a la degradación por tripsina (Fig. 12. A-C, carriles f y h). Dado que en esta cepa no es relevante la glicosilación de VP7, una posibilidad es que el plegamiento es dirigido o ayudado por NSP4, o que la función de alguna(s) de las chaperonas del RE se vea afectada por el tratamiento con TM (ver más adelante).

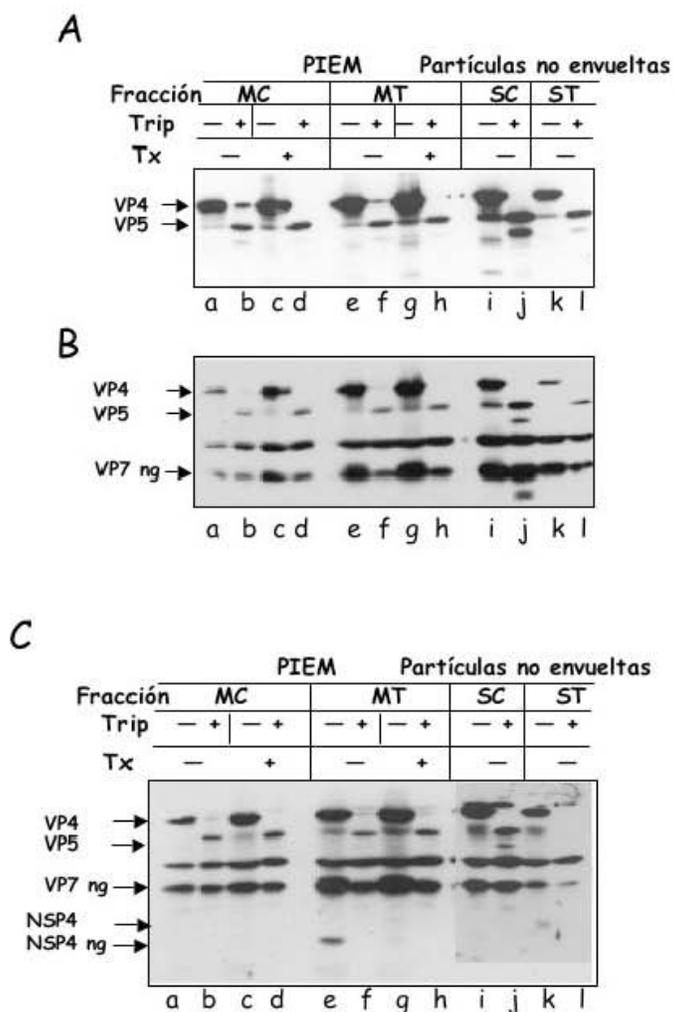


Fig. 12. Distribución de las proteínas que conforman las partículas virales de SA11(28) en las fracciones soluble y membranal. Las fracciones soluble y de membranal del gradiente se trataron o no con Tritón X-100 y posteriormente se trataron o no con tripsina. Al término de cada tratamiento, las muestras se sedimentaron a través de un colchón de sacarosa, las pastillas resultantes se resuspendieron en solución de lisis, y el contenido de proteínas virales se analizó por SDS-PAGE al 10 %. A) Western blot utilizando el Mab HS2 que tñe a las proteínas virales VP4 y VP5, B) la misma membrana se incubó después con el anticuerpo α -rotavirus para tñer a las proteínas estructurales. C) Western blot utilizando los anticuerpos α -NSP4 y α -rotavirus para revelar a las proteínas estructurales y a la proteína NSP4. MC (fracción membranal) y SC (fracción soluble) de células infectadas control. MT (fracción membranal) y ST (fracción soluble) de células infectadas tratadas con TM. Cada carril representa el resultado de un colchón de sacarosa, denotado con una letra (a-l), que explica cada tratamiento.

Sin embargo, estos resultados no nos permiten concluir, si VP7 se encuentra parcialmente expuesta atravesando la envoltura en la PIEM o si durante el evento de translocación de VP7 hacia el interior de la envoltura de la PIEM, la proteína permanece totalmente hacia el interior de la envoltura de ésta. Esta posibilidad es debida a que solamente cuando se inhibe la glicosilación, es cuando la VP7 se convierte susceptible a la digestión por tripsina aún y cuando la membrana de la PIEM se encuentra presente. Esto sugiere que posiblemente la proteína VP7 al no plegarse en su forma nativa impide que se lleve a cabo el evento de translocación correctamente (ver Fig. 7), lo cual probablemente dé como resultado que la proteína VP7 se encuentre parcialmente expuesta por fuera de la envoltura de la PIEM. Para demostrar cuál es la topología de VP7 en la PIEM se tendrían que realizar ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos con especificidad para VP7 y también ensayos con la enzima endoglicosidasa H que corta específicamente los azúcares de alta manosa, además de probar la susceptibilidad de esta proteína a diferentes proteasas.

Debido a que el RE es un sitio que mantiene un ambiente enriquecido en chaperonas, enzimas para la glicosilación y oxidoreductasas, se ha observado que cuando se inhibe la N-glicosilación con TM las proteínas se pliegan de manera incorrecta o incompleta, fallando en alcanzar su conformación nativa. Si éstas no pasan por el control de calidad que existe en el RE, son retenidas y eventualmente degradadas. Es importante aclarar que no todas las glicoproteínas son igual de dependientes de la presencia de sus glicanos para plegarse o secretarse. Al eliminar los glicanos, muchas proteínas sólo pierden de manera parcial su eficiencia de plegamiento o de secreción; otras se vuelven sensibles a la temperatura y muchas no son afectadas. La importancia de la glicosilación es variable, pero, como regla, el plegamiento de las glicoproteínas que presentan muchos glicanos es más dependiente de los glicanos. En otros estudios se ha observado que las proteínas, al no

ser glicosiladas, se vuelven susceptibles a la proteólisis (23, 29). Sin embargo, para evitar que el proceso del plegamiento de las proteínas falle, dos distintos procesos han sido descritos: la degradación asociada al RE (ERAD; ER-associated degradation) y la respuesta a proteínas no plegadas (UPR; unfolded protein response). En el primero, las proteínas mal plegadas son retrotranslocadas a través de la membrana del RE hacia el citosol, donde enzimas conjugadas a ubiquitina las dirigen para su degradación en el proteasoma. En el segundo, se sobreexpresan genes de chaperonas y de factores de degradación para replegar o eliminar a las proteínas mal plegadas. A su vez, la traducción de proteínas se atenúa, ya que como consecuencia de la acumulación de proteínas no plegadas en el RE, se activa la cinasa PERK que fosforila a eIF2 α , para así reducir el efecto de proteínas mal plegadas (33, 37, 71, 72).

En estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se encontró que chaperonas del RE interaccionan con las proteínas virales de rotavirus (Maruri, *et al.* en preparación). Por ejemplo, se ha observado que NSP4 interacciona con PDI (protein disulfure isomerase) y con calnexina, la cual esta implicada en el sistema de control de calidad del RE. Esta chaperona, junto con la calreticulina, asisten el plegamiento de las glicoproteínas en este organelo (29, 46, 48). En este trabajo, no pudimos diferenciar si NSP4 se encontraba mal plegada cuando se usó TM, pero lo más probable es que no se pliegue correctamente al igual que VP7 y VP4. Se ha observado que VP4 y VP7 interaccionan con las chaperonas BiP (GRP78) y endoplasmina (GRP94) y se ha sugerido que probablemente estas chaperonas ayuden a que se plieguen correctamente (74). También, se ha observado que VP7 interacciona con PDI (48), para formar sus puentes disulfuro (Maruri, *et al.* datos no publicados). También por otra parte, dado que el RE se ha descrito como el lugar en donde se forman los puentes disulfuro, lo más probable es que la proteína

VP4, que se traduce en el citoplasma, termine de plegarse correctamente y de formar sus puentes disulfuro en este organelo (7, 15, 51, 61, 72, 73). Como se mencionó, uno de los efectos de la TM es activar la respuesta de UPR, la cual a su vez regula el plegamiento oxidativo (71), el cual implica una serie de reacciones redox que finalmente forman los puentes disulfuro nativos en las proteínas (72).

Con base en estos antecedentes, se puede sugerir que las proteínas VP7 y VP4 podrían no estarse plegando correctamente, o que sus puentes disulfuro no se forman adecuadamente cuando se usa TM, y por lo tanto serían más susceptibles a la digestión por la tripsina. Se ha observado que con el tratamiento con TM, la proteína VP7 presenta puentes disulfuro intercadena, lo que provoca que forme agregados (48). Anteriormente, se había propuesto que la glicosilación de NSP4 era importante para que las PIEM perdieran la envoltura lipídica transitoria; estos resultados se obtuvieron al tratar a las células infectadas con TM, utilizando la cepa mutante SA11(28) (53). Nuestros resultados sugieren que el efecto de no perder la envoltura de las PIEM cuando se usa TM, es más bien debido a que las proteínas no pueden plegarse de manera correcta, lo que resulta en que el proceso normal de maduración del virus no se lleve a cabo correctamente.

Otro de los objetivos de este trabajo fue aislar las PIEM que se producen cuando se inhibe la expresión de VP7, para caracterizar qué proteínas las conforman y cómo es su topología en las PIEM, con la finalidad de tener un primer acercamiento de cómo VP7 está implicada en la remoción de la envoltura transitoria. En estos ensayos, encontramos que las PIEM presentan a las proteínas NSP4 y VP4, además de las proteínas que conforman las DLPs, (Fig. 13. **A** y **B**, carril **e**). Sin embargo, hasta este momento no hemos podido distinguir si existen diferencias con los tratamientos de tripsina y Tritón X-100. Por ejemplo, el tratamiento con Tritón X-100 en este experimento no funcionó, ya que la

proteína NSP4 no se liberó de las PIEM control (Fig. 13. A, carriles c y g), como se había observado en experimentos anteriores. Por lo que se debe de repetir estos experimentos, para poder caracterizar a las PIEM que no presentan VP7.

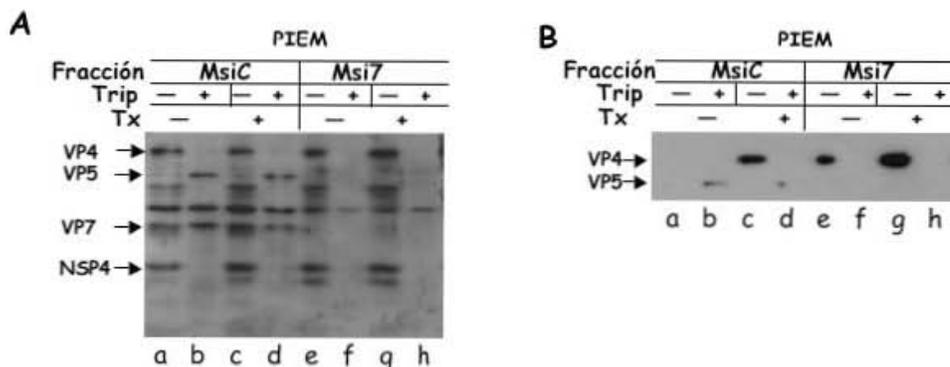


Fig. 13. Proteínas que conforman las partículas virales de RRV cuando se inhibe o no la expresión de VP7 mediante siRNAs. Las fracciones se trataron o no con Tritón X-100 y posteriormente con o sin tripsina. Al término de cada tratamiento, las muestras se sedimentaron a través de un colchón de sacarosa, las pastillas resultantes se resuspendieron en solución de lisis, y el contenido de proteínas virales se analizó por SDS-PAGE al 12.5 o al 10 %, (A y B respectivamente). A) Western blot utilizando los anticuerpos α -NSP4 y α -rotavirus para revelar a las proteínas estructurales y a la proteína NSP4. B) Western blot utilizando el Mab HS2 que muestra la presencia de las proteínas virales VP4 y VP5. Cada carril representa un colchón de sacarosa denotado con una letra (a-h) que especifica cada tratamiento. MsiC (fracción membranal obtenida cuando se usó un siRNA control) y Msi7 (fracción membranal obtenida cuando se inhibió la expresión de VP7 con siRNA-VP7).

Conclusiones

1. Los gradientes discontinuos de optiprep permiten la separación de dos fracciones: la fracción membranal que contiene a las PIEM y la fracción soluble que contiene a los viriones maduros.
2. Cuando las células infectadas son tratadas con TM, la proteína se acumula 78 % más en la fracción de membranal y disminuye 50% en la fracción soluble del gradiente.
3. Las proteínas VP4, VP7 y NSP4 forman parte de las PIEM.
4. Las proteínas VP4 y NSP4 forman parte de las PIEM cuando se inhibe la expresión de VP7.
5. NSP4 interacciona con la PIEM a través de una asociación con la membrana de ésta. En cambio, las proteínas VP4 y VP7 se encuentran interaccionando con la partícula viral a través de una interacción proteína-proteína.
6. La inhibición de la glicosilación podría estar afectando el plegamiento nativo de las proteínas de la capa más externa del virus, VP7 y VP4, ya que éstas son aparentemente más susceptibles a la digestión por la tripsina cuando se inhibe la glicosilación. Al contrario, en células infectadas control la proteína VP4 fue cortada por la tripsina en VP5 y VP8, y la proteína VP7, sin importar si está o no glicosilada, no fue susceptible a la digestión.
7. Hasta ahora no podemos establecer con claridad cual es la topología de VP4, NSP4 y VP7 en las PIEM, pero es claro que la glicosilación juega un papel importante en el plegamiento y ensamblaje de estas proteínas en la partícula viral.

Perspectivas

- Para concluir la caracterización del efecto que tiene la inhibición de la glicosilación sobre las proteínas virales, VP4 y VP7 y NSP4, se podría determinar si estas proteínas forman o no correctamente sus puentes disulfuro. Además se podría buscar qué interacciones de las proteínas virales se pierden o ganan con las chaperonas del RE, al inhibir la glicosilación y la expresión de VP7.
- Un aspecto que sería interesante estudiar es cómo se da el proceso de morfogénesis de rotavirus en células polarizadas CaCO₂ (células epiteliales de cáncer de colon). En estas células polarizadas se ha planteado que las DLPs geman hacia el lumen del RE a través de una interacción con NSP4. Durante este proceso adquieren una envoltura lipídica transitoria junto con NSP4 y VP7. Posteriormente, en el lumen del RE se ensambla la tercera capa, formada por la proteína VP7, sobre las DLPs, formando así una partícula de tres capas envuelta de membrana. Esta PIEM se mueve entonces hacia los sitios de contacto entre el RE y el Golgi para asociarse con los rafts del Golgi. Al mismo tiempo, VP4, que se traduce en el citoplasma, forma un complejo ternario con Rab5 (molécula que regula el tráfico vesicular de endosomas tempranos a lo largo de los microtúbulos) y PRA1 (proteína que interactúa con Rab5 y que se encuentra asociada a los rafts del Golgi). El último paso implica un evento de fusión entre un compartimiento donde se encuentran las PIEM (probablemente derivado del RE), y un compartimiento que contiene rafts en el cual se encuentra el complejo ternario Rab5-PRA1-VP4. Durante este evento de fusión, se pierde la membrana junto con NSP4 y la proteína VP4 se ensambla formándose así las TLPs. Por último las TLPs viajan hacia la zona apical de la célula en vesículas que contienen rafts para poder liberarse al medio (18). Esta

hipótesis esta sustentada por lo siguiente: la proteína VP7 se puede ensamblar correctamente sobre la DLPs en ausencia de VP4, formando partículas glabras o “*spikless* TLPs” (16). La proteína VP4 se localiza en la superficie de la membrana celular asociada a rafts e interactúa con Rab5 y PRA1, además de que la liberación del virus se da del lado apical de la célula a través de los rafts (17, 18). Se ha observado que cuando se inhibe la glicosilación con TM, el proceso de morfogénesis en estas células también se detiene en el lumen del RE, en el estadio de PIEM (17). Nosotros podríamos aislar y caracterizar las PIEM producidas cuando se inhibe la glicosilación en células CaCO₂ y, si esta hipótesis es correcta, esperaríamos encontrar que las PIEM presentaran sólo a las proteínas VP7 y NSP4. Además, se podría comprobar si la proteína VP4 se ensambla en las partículas dentro del lumen del RE o durante el evento de fusión de membranas.

- Una de las hipótesis planteada en el laboratorio acerca del proceso de remoción de la envoltura lipídica transitoria de la PIEM, surge de la observación de que la capa que forma la proteína VP7, en el virion maduro, se arregla en trímeros de VP7, los cuales dependen de la concentración de calcio (42). Con base en estos resultados, se ha propuesto que una vez que las PIEM se encuentran dentro del RE, en presencia de un ambiente de alta concentración de calcio, las proteínas VP7 orientadas en un principio por fuera de la envoltura de la PIEM, interaccionan con el calcio, lo cual promueve que se trimericen y que pueda translocarse hacia el interior de la envoltura lipídica, excluyendo así a los lípidos junto con NSP4 (41). Sin embargo, como ya se había mencionado, no se cuenta aún con un sistema de genética reversa disponible para rotavirus. Debido a esto, la caracterización *in vivo* de la función de los genes de rotavirus ha estado limitada a variantes que escapan a cierta presión de

selección por anticuerpos, a mutantes termosensibles y a rearreglantes (2). Por ello, sería importante desarrollar un sistema de complementación fenotípica para rescatar la función de VP7. Esto es, expresar una proteína VP7 heteróloga proveniente de otra cepa de rotavirus que no presente 100 % de homología en la secuencia de RNA mensajero con la secuencia del siRNA-VP7, con el propósito de sólo inhibir la expresión de la proteína VP7 de RRV y no la de la VP7 heteróloga, lo cual permitirá que la morfogénesis del virus, que se encuentra arrestada dentro del lumen del RE, prosiga. Esto ocurriría, suponiendo que la VP7 heteróloga sea capaz de sustituir la función de la proteína homóloga al remover la envoltura lipídica transitoria y que se ensamble junto con la proteína VP4 sobre las DLPs para formar partículas de tres capas o TLPs. Este sistema de complementación fenotípica nos permitirá evaluar específicamente cuáles son las funciones determinantes de las proteínas, como, por ejemplo, quitar los posibles sitios de unión a calcio de la proteína VP7, para probar la hipótesis de remoción de la envoltura, arriba mencionada.

- **Bibliografía**

1. **Arias, C., and S. López.** Los Rotavirus. *In* E. Martínez and J. C. Martínez (ed.), *Microbios*.
2. **Arias, C. F., M. A. Dector, L. Segovia, T. Lopez, M. Camacho, P. Isa, R. Espinosa, and S. Lopez.** 2004. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* **102**:43-51.
3. **Arias, C. F., C. A. Guerrero, E. Mendez, S. Zarate, P. Isa, R. Espinosa, P. Romero, and S. Lopez.** 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Found Symp* **238**:47-60; discussion 60-3.
4. **Arias, C. F., S. Lopez, and R. T. Espejo.** 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J Virol* **41**:42-50.
5. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López.** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* **70**:5832-5839.
6. **Au, K. S., W. K. Chan, J. W. Burns, and M. K. Estes.** 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein. NS28. *J Virol* **63**:4553-62.
7. **Bardwell, J. C.** 2002. Disulfide bond formation, a race between FAD and oxygen. *Dev Cell* **3**:758-60.
8. **Bergmann, C. C., D. Maass, M. S. Poruchynsky, P. H. Atkinson, and A. R. Bellamy.** 1989. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *Embo J* **8**:1695-703.
9. **Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, and R. Scherrer.** 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol* **43**:1113-7.
10. **Bowman, G. D., I. M. Nodelman, O. Levy, S. L. Lin, P. Tian, T. J. Zamb, S. A. Udem, B. Venkataraghavan, and C. E. Schutt.** 2000. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J Mol Biol* **304**:861-71.
11. **Browne, E. P., A. R. Bellamy, and J. A. Taylor.** 2000. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J Gen Virol* **81**:1955-9.
12. **Clarke, M. L., L. J. Lockett, and G. W. Both.** 1995. Membrane binding and endoplasmic reticulum retention sequences of rotavirus VP7 are distinct: role of carboxy-terminal and other residues in membrane binding. *J Virol* **69**:6473-8.
13. **Coulson, B. S., L. E. Unicomb, G. A. Pitson, and R. F. Bishop.** 1987. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. *J Clin Microbiol* **25**:509-15.
14. **Crawford, S. E., M. Labbe, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou, and M. K. Estes.** 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* **68**:5945-52.
15. **Cumming, R. C., N. L. Andon, P. A. Haynes, M. Park, W. H. Fischer, and D. Schubert.** 2004. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* **279**:21749-58.
16. **Déctor, M. A., P. Romero, S. López, and C. F. Arias.** 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO reports* **3**:1175-1180.
17. **Delmas, O., A. M. Durand-Schneider, J. Cohen, O. Colard, and G. Trugnan.** 2004. Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized caco-2 cells. *J Virol* **78**:10987-94.
18. **Delmas, O., A. Gardet, S. Chwetzoff, M. Breton, J. Cohen, O. Colard, C. Sapin, and G. Trugnan.** 2004. Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology* **327**:157-61.
19. **Denisova, E., W. Dowling, R. LaMonica, R. Shaw, S. Scarlata, F. Ruggeri, and E. R. Mackow.** 1999. Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes. *J Virol* **73**:3147-53.
20. **Dormitzer, P. R., and H. B. Greenberg.** 1992. Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. *Virology* **189**:828-32.
21. **Dormitzer, P. R., H. B. Greenberg, and S. C. Harrison.** 2000. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* **277**:420-8.
22. **Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl.** 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**:199-213.

23. **Ellgaard, L., and A. Helenius.** 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:181-91.
24. **Estes, M. K.** 2001. Rotaviruses and their replication., p. 1747-1785. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
25. **Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, and C. P. Gerba.** 1979. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol*:403-408.
26. **Fuentes Panana, E. M., S. Lopez, M. Gorziglia, and C. F. Arias.** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* **69**:2629-32.
27. **Gajardo, R., P. Vende, D. Poncet, and J. Cohen.** 1997. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J Virol* **71**:2211-2216.
28. **Gilbert, J. M., and H. B. Greenberg.** 1998. Cleavage of rhesus rotavirus VP4 after arginine 247 is essential for rotavirus-like particle-induced fusion from without. *J Virol* **72** (6):5323-5327.
29. **Helenius, A., and M. Aebi.** 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**:1019-49.
30. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson.** 2000. Integrins a2b1 and a4b1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* **74**:228-236.
31. **Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock.** 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:8701-4.
32. **Isa, P., S. Lopez, L. Segovia, and C. F. Arias.** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol* **71**:6749-56.
33. **Isler, J. A., A. H. Skalet, and J. C. Alwine.** 2005. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* **79**:6890-9.
34. **Kabcenell, A. K., and P. H. Atkinson.** 1985. Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J Cell Biol* **101**:1270-80.
35. **Kabcenell, A. K., M. S. Poruchynsky, A. R. Bellamy, H. B. Greenberg, and P. H. Atkinson.** 1988. Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J Virol* **62**:2929-41.
36. **Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, and R. M. Chanock.** 2001. Rotavirus., p. 1787-17833. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
37. **Kaufman, R. J., D. Scheuner, M. Schroder, X. Shen, K. Lee, C. Y. Liu, and S. M. Arnold.** 2002. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:411-21.
38. **Larralde, G., and M. Gorziglia.** 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J Virol* **66**:7438-43.
39. **Lopez, S., and C. F. Arias.** 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* **12**:271-8.
40. **Lopez, S., C. F. Arias, E. Mendez, and R. T. Espejo.** 1986. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* **154**:224-7.
41. **Lopez, T., M. Camacho, M. Zayas, R. Najera, R. Sanchez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* **79**:184-92.
42. **Maass, D. R., and P. H. Atkinson.** 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol* **64**:2632-41.
43. **Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan, and H. B. Greenberg.** 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol* **63**:1661-8.
44. **Mattion, N. M., J. Cohen, and M. K. Estes.** 1994. The rotavirus proteins., p. 169-249. *In* A. Z. Kapikian (ed.), *Viral infections of the gastrointestinal tract*. Marcel Dekker, New York.
45. **Michelangeli, F., F. Liprandi, M. E. Chemello, M. Ciarlet, and M. C. Ruiz.** 1995. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *J Virol* **69**:3838-47.
46. **Mirazimi, A., M. Nilsson, and L. Svensson.** 1998. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J Virol* **72**:8705-9.

47. **Mirazimi, A., and L. Svensson.** 2000. ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J Virol* **74**:8048-52.
48. **Mirazimi, A., and L. Svensson.** 1998. Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7. *J Virol* **72** (5):3887-3892.
49. **Moller-Larsen, A., and T. Christensen.** 1998. Isolation of a retrovirus from multiple sclerosis patients in self-generated Iodixanol gradients. *J Virol Methods* **73**:151-61.
50. **Mori, K.** 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**:451-4.
51. **Patton, J. T., J. Hua, and E. A. Mansell.** 1993. Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J Virol* **67**:4848-55.
52. **Perez, J. F., M. E. Chemello, F. Liprandi, M. C. Ruiz, and F. Michelangeli.** 1998. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. *Virology* **252**:17-27.
53. **Petrie, B. L., M. K. Estes, and D. Y. Graham.** 1983. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J Virol* **46**:270-4.
54. **Poruchynsky, M. S., and P. H. Atkinson.** 1988. Primary sequence domains required for the retention of rotavirus VP7 in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **107**:1697-706.
55. **Poruchynsky, M. S., and P. H. Atkinson.** 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* **65**:4720-7.
56. **Poruchynsky, M. S., D. R. Maass, and P. H. Atkinson.** 1991. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J Cell Biol* **114**:651-6.
57. **Poruchynsky, M. S., C. Tyndall, G. W. Both, F. Sato, A. R. Bellamy, and P. H. Atkinson.** 1985. Deletions into an NH₂-terminal hydrophobic domain result in secretion of rotavirus VP7, a resident endoplasmic reticulum membrane glycoprotein. *J Cell Biol* **101**:2199-209.
58. **Prasad, B. V., S. Crawford, J. A. Lawton, J. Pesavento, M. Hardy, and M. K. Estes.** 2001. Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp* **238**:26-37; discussion 37-46.
59. **Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu.** 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* **199**:269-75.
60. **Prasad, B. V. V., R. Rothnagel, C. Q. Y. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, and M. K. Estes.** 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* **382** (6590):471-473.
61. **Rietsch, A., and J. Beckwith.** 1998. The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu Rev Genet* **32**:163-84.
62. **Ruiz, M. C., A. Charpilienne, F. Liprandi, R. Gajardo, F. Michelangeli, and J. Cohen.** 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol* **70** (8):4877-83.
63. **Shahrabadi, M. S., L. A. Babiuk, and P. W. Lee.** 1987. Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology* **158**:103-11.
64. **Su, C. Q., Y. L. Wu, H. K. Shen, D. B. Wang, Y. H. Chen, D. M. Wu, L. N. He, and Z. L. Yang.** 1986. An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *J Med Virol* **19**:167-73.
65. **Suzuki, H., T. Sato, T. Konno, S. Kitaoka, T. Ebina, and N. Ishida.** 1984. Effect of tunicamycin on human rotavirus morphogenesis and infectivity. Brief report. *Arch Virol* **81**:363-9.
66. **Taylor, J. A., and A. R. Bellamy.** 2003. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components, p. 225-235. *In* E. Science (ed.), *Viral Gastroenteritis*. In U. Desselberg and J.Gray (ed.), Amsterdam.
67. **Taylor, J. A., J. A. O'Brien, and M. Yeager.** 1996. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *Embo J* **15**:4469-76.
68. **Tian, P., J. M. Ball, C. Q. Y. Zeng, and M. K. Estes.** 1996. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol* **70** (10):6973-6981.
69. **Tian, P., M. K. Estes, Y. Hu, J. M. Ball, C. Q. Zeng, and W. P. Schilling.** 1995. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **69**:5763-72.

70. **Tian, P., Y. Hu, W. P. Schilling, D. A. Lindsay, J. Eiden, and M. K. Estes.** 1994. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol* **68**:251-7.
71. **Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman, and P. Walter.** 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**:249-58.
72. **Tu, B. P., and J. S. Weissman.** 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* **164**:341-6.
73. **Woycechowsky, K. J., and R. T. Raines.** 2000. Native disulfide bond formation in proteins. *Curr Opin Chem Biol* **4**:533-9.
74. **Xu, A., A. R. Bellamy, and J. A. Taylor.** 1998. BiP (GRP78) and endoplasmic reticulum (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *J Virol* **72**:9865-72.
75. **Yolken, R., J. S. Arango, J. Eiden, and S. Vonderfecht.** 1988. Lack of genomic reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. *J Infect Dis* **158**:1120-3.
76. **Zayas, M. L.** 2003. Manipulación de la expresión genética de la glicoproteína VP7 de los rotavirus. Licenciatura. UNAM, México, D.F.