



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**El papel de chaperonas moleculares del
retículo endoplásmico en la morfogénesis
de rotavirus**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

LILIANA MARURI AVIDAL



DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS F. ARIAS ORTIZ

CUERNAVACA, MORELOS ABRIL, 2008



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 y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Arias Ortiz. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACyT y DGEP.

Dedicada a mis padres por todo su amor
y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A Camilo ♥

Al Dr. Carlos F. Arias por aceptar ser mi asesor, por creer en mí y por sus enseñanzas para prepararme como investigador.

A la Dra. Susana López por sus comentarios para ayudarme a ser mejor y por la revisión de esta tesis.

A mi comité tutorial, Dr. Jean Louis Chali y Dr. Fernando Esquivel por las sugerencias y comentarios.

A mis sinodales Dr. Ramón González, Dra. Alejandra Covarruvias, Dra. Rosana Sánchez y Dr. Lorenzo Segovia por la revisión de esta tesis.

A los integrantes del grupo Arias/López que me ayudaron y me brindaron su amistad: Pedro, Ernesto, Rafa, Déctor, Pavel, Jimena, Mauricio, Minerva, Tomás, Hilda y Margara.

A mis Amigos que hicieron mi estancia en el laboratorio placentera: Margarito, Miriam, Mery, Denisse, Lulú, Diana, Marco A y Michelle.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
Asn	Asparagina
ATF6	Factor activador de transcripción 6
ATP	Adenosin trifosfato
BiP	Proteína que se une a la cadena pesada de las inmunoglobulinas
Ca²⁺	Calcio
cDNA	DNA complementario
Cl	Cloro
CsCl	Cloruro de cesio
CST	Castanospermina
DLP	Partículas virales de doble capa
DTT	Dithiotreitol
EDEM	Proteína de degradación tipo manosidasa
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilenglicoltetraacético
eIF2α	Factor de inicio de la traducción
ERAD	Proteínas del RE asociadas a degradación
ERGIC-53	Compartimento intermediario del RE-Golgi 53
ERp57	Proteína regulada por glucosa 58
ERSE	Elemento de respuesta a estrés
F25	Frasco para cultivo de 25 cm ²
GAPDH	Gliceraldehido fosfatodeshidrogenasa
Grp	Proteínas reguladas por glucosa
Grp78	Proteína regulada por glucosa 78
Grp94	Proteína regulada por glucosa 94
HA	Hemaglutinina de Influenza
hpi	Horas post-infección
Hsc70	Proteína de choque termico constitutiva
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
IF	Inmunofluorescencia
IRE1	Proteína que requiere inositol RE 1
IRF	Factores regulatorios de interferón
kDa	kilodaltones
KDEL	Lisina, Asparagina, Glutámico, Leucina
MBq	megabecquerel
mCi	milicurie
MEM	medio mínimo esencial
mg	Miligramos

min	minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanomolar
PBS	Amortiguador salido de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PERK	Proteína cinasa de RE
pH	Potencial de hidrógeno
PI3	Inositol trifosfato
PLC	Fosfolipasa C
RE	Retículo Endoplásmico
RIPA	Radio inmunoprecipitación
RNA	Ácido ribonucleico
RNAdc	RNA de doble cadena
RNAi	RNA de interferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RRV	Cepa de rotavirus de mono <i>rhesus</i>
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
siRNA	RNA interferente pequeño
SN	Sobrenadante
TA	Temperatura ambiente
Thr	Treonina
TLP	Partícula viral del triple capa
TNC	Amortiguador con Tris, NaCl y CaCl
TSG	Tapsigargina
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
VIP36	Lectina de unión a manosa
VIPL	Proteína de unión a manosa como VIP36
Vol	Volumen
Xbp1	Proteína 1 de union a la caja X

Indice

RESUMEN	2
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	4
Ensamble de Virus	4
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO	5
Glicosilación y procesamiento de los oligosacáridos	6
Formación de los puentes disulfuro	7
Plegamiento y Chaperonas Moleculares en el RE	8
Complejos de plegamiento en RE	10
Ciclo Grp78 ADP/ATP	10
Ciclo calnexina-calreticulina	11
Proteínas virales que son plegadas por las chaperonas celulares	12
Respuesta a Proteínas no Plegadas en RE	12
ROTAVIRUS	14
Tropismo del virus	14
Patogénesis viral	15
Clasificación del virus	15
Estructura del virus	16
Genoma Viral	16
Proteínas de Rotavirus	17
Proteínas virales traducidas en los ribosomas libres que se encuentran en el citoplasma	17
Proteínas virales traducidas en RE	19
Ciclo Viral	23
Unión y entrada del virus a la célula	23
Transcripción y Replicación	24
Plegamiento y morfogénesis viral	24
Liberación del virus	25
ANTECEDENTES	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y METODOS	29
RESULTADOS	38
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	71
ANEXO I	72
ANEXO II	130
Resultados Adicionales	131
REFERENCIAS	145

RESUMEN

El Retículo Endoplásmico (RE) provee un ambiente oxidante que permite la formación de los puentes disulfuro en las proteínas, además de contener chaperonas moleculares y enzimas de plegamiento que interactúan transitoriamente con las proteínas durante su síntesis para asistirles en el plegado correcto y así prevenir su agregación.

Los rotavirus utilizan el RE para su maduración y se ha visto que tratamientos que modifican la glicosilación de las proteínas virales NSP4 y VP7, o que alteran la concentración de calcio en el RE, afectan la morfogénesis del virus, y que las chaperonas Grp78, Grp94, PDI y Calnexina interactúan con algunas proteínas de los rotavirus. En este trabajo evaluamos el papel de Grp78, Grp94, PDI, calreticulina, calnexina y ERp57, sobre la morfogénesis de rotavirus, utilizando el sistema de interferencia del RNA.

Encontramos que las chaperonas lumbales de RE sufren un agrupamiento dependiente del tiempo de infección hacia donde se encuentran las proteínas virales de RE (NSP4 y VP7).

Además observamos que la producción de progenie viral infecciosa de rotavirus no se afecta al silenciar los genes de Grp94 y ERp57. Por otro lado, la presencia de PDI es importante para producir progenie viral infecciosa y reorganizar los puentes disulfuro en VP7.

La presencia de calreticulina en el RE, es importante para formar progenie viral infecciosa y mantener la velocidad en el arreglo de los puentes disulfuro en VP7.

Al silenciar el gen de Grp78, el plegamiento de las proteínas VP7 y NSP4 se alteró, por lo que la progenie viral disminuyó. En estas condiciones aumentó la producción de partículas virales, pero su infectividad específica disminuyó un 50%. Además la unión de éstas a las células se vio disminuida un 50%, por lo que concluimos que en ausencia de Grp78 hay cambios conformacionales en la proteína viral encargada de la unión del virus a la superficie celular.

Cuando silenciamos el gen de calnexina, observamos que disminuye la infectividad del virus obtenido en estas condiciones, y la mitad de las partículas que se ensamblan no son infecciosas, sin embargo, estas partículas son capaces de unirse a la célula huésped, por lo que la deficiencia en la estructura del virus afecta su infectividad en un paso posterior a su unión con la célula, lo que podría deberse a que en estas condiciones la proteína VP7 no se pliega adecuadamente.

Estos resultados sugieren que las proteínas Grp78, PDI, calnexina y calreticulina participan en el proceso de morfogénesis de rotavirus.

SUMMARY

The endoplasmic reticulum (ER) provides an oxidant environment to allow the correct folding of secretion proteins and also contains molecular chaperones and folding enzymes that transiently interact with the synthesized proteins and help them to acquire a correct folding.

The assembly process of rotavirus occurs in the ER. It has been shown that *i*) treatments which affect the glycosylation of viral proteins VP7 and NSP4 or change the calcium concentration, affect the virus morphogenesis and *ii*) the chaperones Grp78, Grp94, PDI and calnexin interact with rotavirus polypeptides. In this work we evaluated the role of Grp78, Grp94, PDI, calreticulin, calnexin and ERp57 in rotavirus morphogenesis by using the small interference RNA system.

We found that the luminal molecular chaperones change their distribution upon rotavirus infection accumulating near of the ER glycoproteins (VP7 and NSP4) and this change depends on the time post-infection.

Also, we found that the rotavirus infectivity does not change when grp94 and ERp57 expression was silenced. On the other side, the interaction between PDI and VP7 is relevant for the formation and rearrangement of the disulfide bonds of this viral protein.

Calreticulin is important to produce infectious viral particles and as part of the ER-folding quality control for the viral proteins.

In cells transfected with siRNA of Grp78, the VP7 and NSP4 folding were altered. The virus infectivity decreased, although the yield of viral particles was increased, but their specific infectivity was reduced to approximately 50%. Half of these particles were incompetent for binding to the host cells. We conclude that in absence of Grp78 there are conformational changes in the protein responsible for the initial binding to the host-cell.

When calnexin was silenced, the yield of viral progeny decreased and 50% of the assembled particles were not infectious, however these particles were able to bind to the cell surface. Therefore, the structural deficiency of the virus affects a step after the initial binding.

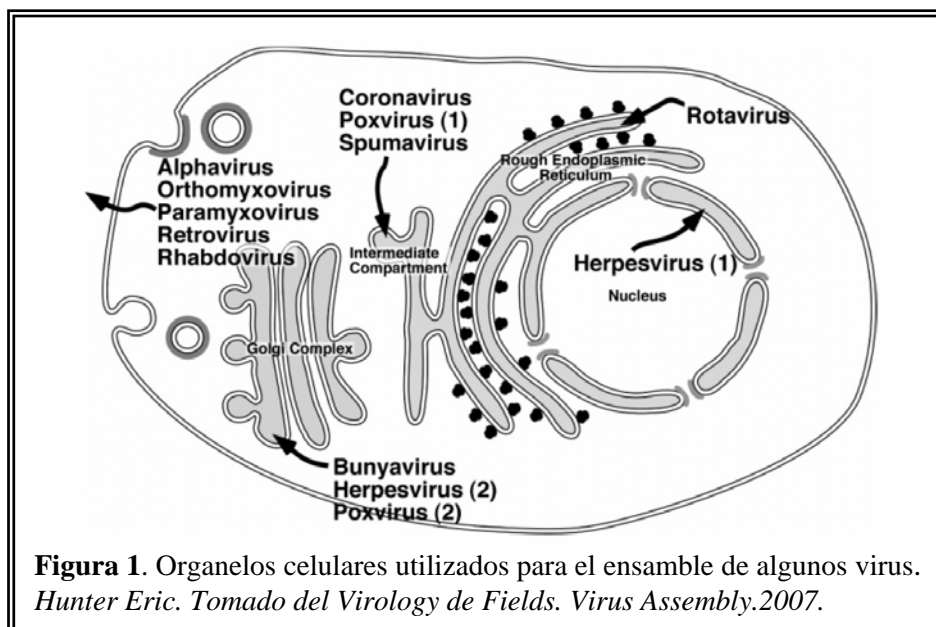
These results suggest that Grp78, PDI, calnexin and calreticulin proteins participate in the morphogenesis process of rotavirus.

INTRODUCCIÓN

Ensamble de Virus

El proceso de ensamble de diferentes virus se lleva a cabo en distintos compartimientos celulares, dependiendo principalmente de la genética y naturaleza del virus (Pettersson 1991; Stephens and Compans 1988). Muchos virus con membrana (retro, alfa, ortomixovirus, rabdo y paramixovirus) adquieren sus envolturas en la membrana plasmática, permitiendo a los viriones maduros ser liberados al medio extracelular (Pettersson 1991; Stephens and Compans 1988). Otros virus son ensamblados en membranas intracelulares, por ejemplo el ensamble de bunyavirus se da mediante la gemación en las cisternas del complejo de Golgi (Matsuoka et al. 1991), coronavirus gema en el compartimiento intermedio entre el Retículo endoplásmico (RE) y el Golgi (ERGIC) (Griffiths and Rottier 1992; Hobman 1993; Tooze et al. 1984), rotavirus se ensambla en la membrana del RE (Kabcenell and Atkinson 1985; Pettersson 1991; Poruchynsky et al. 1985), herpesvirus y orthomixovirus comienzan su ensamble en la membrana nuclear interna (Griffiths and Rottier 1992; Stephens and Compans 1988) y los adenovirus se ensamblan en el núcleo celular (Figura 1).

A pesar de que la mayoría de los virus inician o completan su ensamble asociados a membranas como en los ejemplos anteriores, también hay virus como los reovirus que se ensamblan enteramente en el citoplasma sin involucrar membranas (Hunter 2007).



Uno de los factores que parece determinar el sitio de ensamble de los virus en casi todos los casos, es la acumulación y maduración de la envoltura viral o de las proteínas de la capa externa en el sitio final de ensamble.

En general, el proceso de ensamble inicia con la interacción de la nucleocápside con las glicoproteínas virales. Posteriormente, los virus maduros son usualmente transportados fuera de las células a través de un proceso de exocitosis.

Hasta el momento, los rotavirus son los únicos virus que utilizan el RE para ensamblarse (Poruchynsky et al. 1985) y se ha observado que en células no polarizadas permanecen en el lumen del RE hasta la lisis celular (Altenburg et al. 1980; Musalem and Espejo 1985).

El papel de seis chaperonas celulares del RE en el ensamble de los rotavirus fue el motivo de estudio en esta tesis.

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

La membrana del RE constituye más de la mitad de la fracción endomembranal de la célula y juega un papel central en la biosíntesis celular. Las funciones de el RE varían dependiendo del tipo de RE, existen tres variedades llamadas Retículo endoplásmico rugoso (RER), Retículo Endoplásmico liso (REL) y Retículo sarcoplásmico (RS). El REL es liso porque no tiene ribosomas, mientras que el RER posee ribosomas en la superficie de la membrana. El RS se encuentra en células de músculo.

Los ribosomas unidos al RER sintetizan a las todas las proteínas de la ruta secretoria de la célula. Estos ribosomas se unen al RER por la cadena polipeptídica de la proteína que se está sintetizando, este péptido de aproximadamente 20 aa y de carácter hidrofóbico se conoce como péptido señal; el polipéptido que emerge de los ribosomas pasa a través de la membrana del RER por un poro conocido como complejo Sec61p. Las proteínas secretorias sintetizadas se acumulan en el lumen de RER antes de ser transportadas a su destino (Lodish et al. 2000).

El pH en el lumen del RE es cercano a neutro, muy parecido al del citosol (Anderson et al. 1984). En células de mamífero el RE es el sitio con mayor concentración de Ca^{2+} , ya que tiene una concentración de 5 mM aproximadamente, que es muy alta al compararla con la del citosol que es de aproximadamente 0.1 μM (Schroder and Kaufman 2005). El calcio participa en las interacciones electrostáticas de las proteínas, y por lo tanto en su plegamiento. Por ejemplo los trímeros de la glicoproteína de rotavirus VP7 recombinante son estables gracias al Ca^{2+} (Dormitzer et al. 2000). Más importante aún, la mayoría de las chaperonas moleculares y enzimas de plegamiento residentes del RE, tienen una baja afinidad a Ca^{2+} y alta capacidad de unión por este ión. La mayoría del calcio almacenado en este compartimento se encuentra unido a las proteínas lumbales como son las chaperonas entre otras y, perturbaciones en la concentración del Ca^{2+} luminal pueden inhibir la función de las chaperonas moleculares (Corbett et al. 1999; Ou et al. 1995; Suzuki et al. 1991).

El RE es un compartimento especializado en donde ocurren procesos importantes para mantener la homeostasis celular, tales como: la traducción de proteínas de la ruta secretoria, la

formación de puentes disulfuro en proteínas, la N-glicosilación, el plegamiento y el transporte de estas proteínas a sitios específicos en la célula o al medio extracelular (Sitia and Braakman 2003).

Glicosilación y procesamiento de los oligosacáridos

La adición de oligosacáridos a las proteínas que se están sintetizando en el RE, es una de las funciones principales del RE. En la N-glicosilación, la unidad del oligosacárido precursor está compuesta por 2 N-acetil glucosaminas, 9 manosas y 3 glucosas. Esta unidad es ensamblada en el RE en el lípido acarreador dolicolfosfato, y una vez ensambladas estas unidades son transferidas por medio de una glicosiltransferasa del dolicol a un residuo amino de la asparagina, localizada en la proteína que se está sintetizando con la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (Hubbard and Ivatt 1981; Kornfeld and Kornfeld 1985). El proceso de transferencia ocurre co-traduccionalmente para asegurar el acceso a los residuos de asparagina (Figura2).

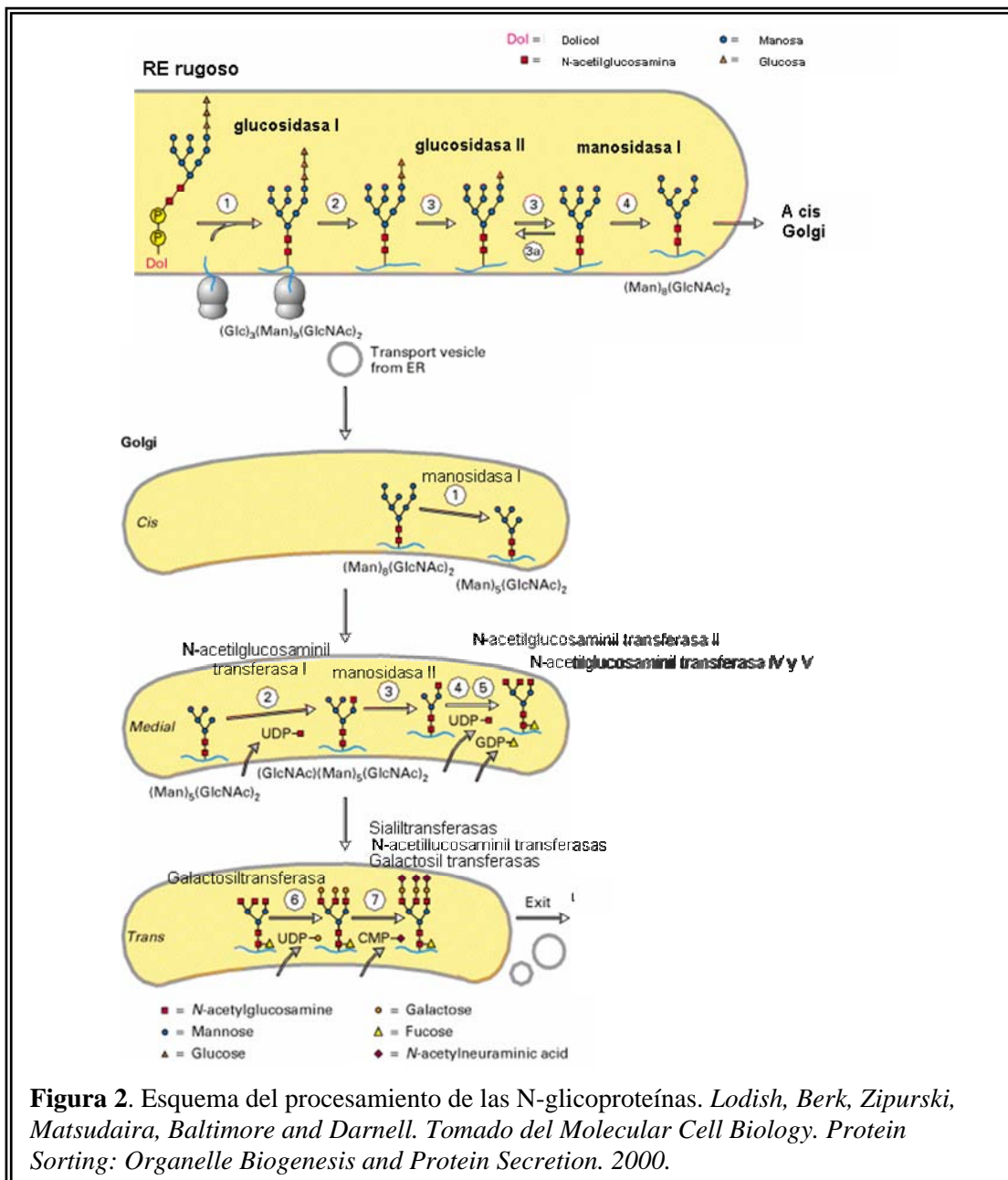


Figura 2. Esquema del procesamiento de las N-glicoproteínas. *Lodish, Berk, Zipurski, Matsudaira, Baltimore and Darnell. Tomado del Molecular Cell Biology. Protein Sorting: Organelle Biogenesis and Protein Secretion. 2000.*

La N-glicosilación es seguida por el procesamiento del oligosacárido en el lumen del RE. La glucosidasa I es la responsable de remover a la primera glucosa, la glucosidasa II remueve a la segunda y tercer glucosas (Grinna and Robbins 1979) y posteriormente la manosidasa I, es responsable de remover a la manosa 9. Puede haber una re-adición de un residuo de glucosa (Figura 2 paso 3a), lo cual es parte del proceso del control de calidad en el RE (Sousa and Parodi 1995) (ver más adelante). Lo anterior puede ocurrir co-traduccionalmente o una vez que la proteína ha sido sintetizada.

Posteriormente, la proteína debe ser transportada en una vesícula hacia el cis-Golgi para que se sigan procesando los oligosacáridos. Una vez que la proteína llega al cis-Golgi, la manosidasa I remueve una manosa dando lugar a un oligosacárido formado por Man₅GlcNAc₂ (Figura 2) (Kornfeld and Kornfeld 1985).

En el Golgi-medio, los oligosacáridos se procesan por la remoción de residuos de manosa por una α -manosidasa II, y la subsecuente adición de una N-acetilglucosamina. La fucosiltransferasa puede agregar residuos de fucosa al oligosacárido procesado. El último paso en el procesamiento de los oligosacáridos ocurre en el compartimiento del trans-Golgi, en el cual la galactosil y la sialil transferasa agregan galactosa y ácido siálico al oligosacárido respectivamente (Figura 2) (Kornfeld and Kornfeld 1985). En general, tres formas principales de unidades de oligosacáridos pueden ser detectadas sobre las glicoproteínas: residuos de alta manosa, oligosacáridos complejos y unidades híbridas de oligosacáridos, lo que depende principalmente del sitio de maduración y acumulación de las proteínas (Kornfeld and Kornfeld 1985).

La glicosilación repercute en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas. Primeramente, la naturaleza hidrofílica de los carbohidratos incrementa la solubilidad y define, las áreas superficiales en algunas proteínas. En segundo lugar, los carbohidratos bloquean la interacción de la proteína a la que están unidos con otras proteínas que se estén sintetizando, evitando así su agregación, por lo que se les atribuye una función como chaperonas. Tercero, los carbohidratos interactúan con los enlaces peptídicos y estabilizan la conformación de la proteína (Wormald and Dwek 1999). Cuarto, el procesamiento secuencial de los azúcares es monitoreado por lectinas que detectan el estado de plegamiento de las proteínas (Ellgaard et al. 1999).

Formación de los puentes disulfuro

El principal amortiguador redox en la célula es el glutatión, el cual contribuye con los equivalentes reductores para la formación de los puentes disulfuro en el RE. En el citoplasma, la proporción de glutatión reducido a glutatión oxidado es >50:1 (Fewell et al. 2001). En contraste,

en el RE, esta proporción es de 1:1 a 3:1. Por lo que el ambiente en el lumen del RE es más reductor que en el citosol (Schroder and Kaufman 2005).

La formación de los puentes disulfuro en el RE es catalizada por las disulfuro isomerasas, y sus puentes disulfuro son formados por oxidasas dependientes de FAD como son Ero1p y ERv2p. El aceptor final de electrones para Ero1p y Erv2p es el O₂ (Schroder and Kaufman 2005).

Plegamiento y Chaperonas Moleculares en el RE

La secuencia de una cadena polipeptídica determina la estructura tridimensional de la proteína, ya que en principio una cadena polipeptídica se puede plegar espontáneamente a su conformación nativa, sin embargo, durante este proceso se pueden generar errores en el plegamiento. El lumen del RE provee un ambiente único para el plegamiento y ensamble de los polipéptidos sintetizados en este compartimiento. Es en este compartimiento que la célula cuenta con un sistema de control de calidad, conformado por chaperonas para determinar plegamientos erróneos en las proteínas y evitar agregados protéicos, ya que solo las proteínas que están plegadas apropiadamente son transportadas del RE al complejo de Golgi. Es por ello que la presencia de chaperonas moleculares y enzimas foldasas es imprescindible (Hammond and Helenius 1994b).

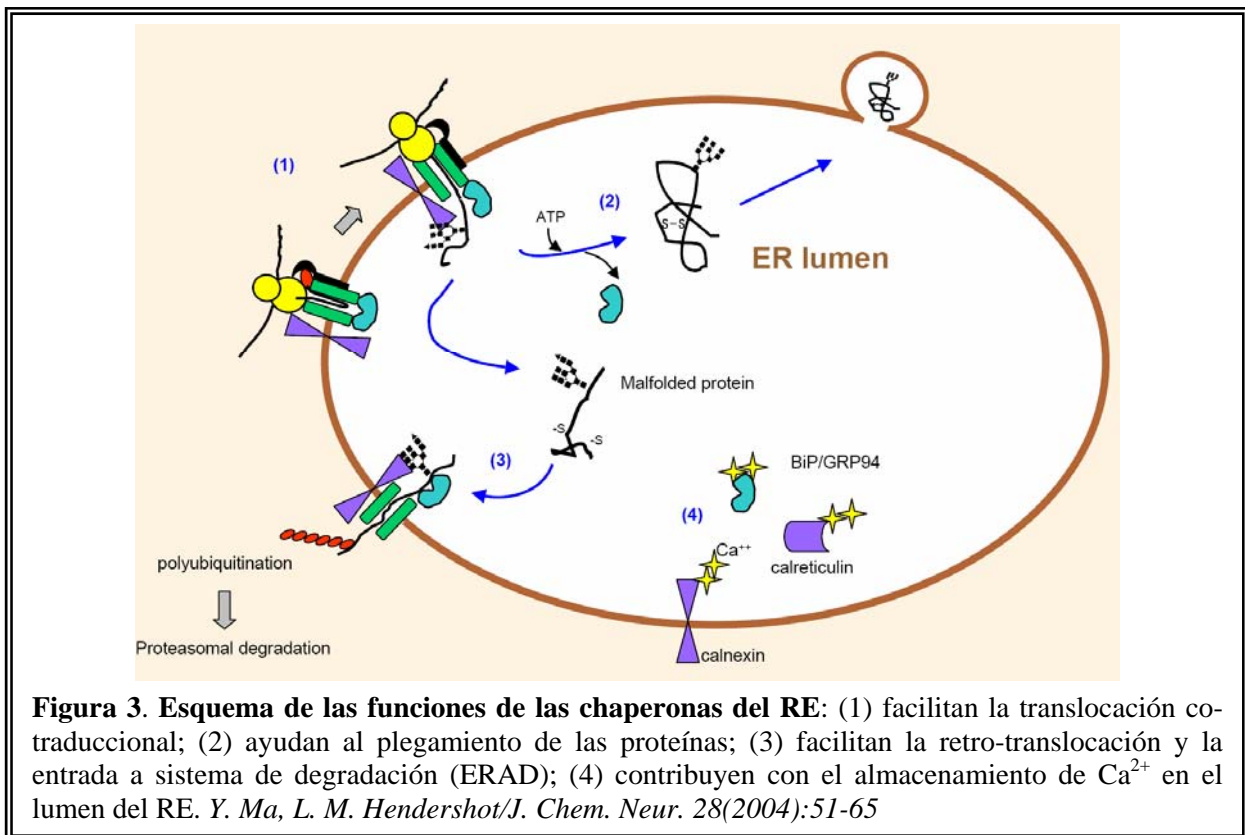


Figura 3. Esquema de las funciones de las chaperonas del RE: (1) facilitan la translocación co-traducciona; (2) ayudan al plegamiento de las proteínas; (3) facilitan la retro-translocación y la entrada a sistema de degradación (ERAD); (4) contribuyen con el almacenamiento de Ca²⁺ en el lumen del RE. *Y. Ma, L. M. Hendershot/J. Chem. Neur. 28(2004):51-65*

Las funciones principales de las chaperonas moleculares del RE son: ayudar a la translocación de las proteínas secretorias al lumen del RE (Nguyen et al. 1991; Vogel et al. 1990), impedir las interacciones inespecíficas entre las proteínas que se están sintetizando y mantenerlas

en un estado apropiado para ser plegadas, de esta manera es que están involucradas en el control de calidad del RE (Hammond and Helenius 1994b). Otra de sus funciones es marcar a las proteínas que tienen un plegamiento incorrecto para ser degradadas y que no continúen por la vía secretora (Figura 3) (Hammond and Helenius 1995; Hurlley et al. 1989; Leitzgen et al. 1997; Pelham 1989; Rothman 1989); a este mecanismo se le conoce como “ER-Associated Protein Degradation” (ERAD) el cual está conservado en eucariotes desde levaduras hasta mamíferos (Hampton 2002; Nishikawa et al. 2001). Brevemente, las proteínas mal plegadas o que se encuentran en exceso son retrotranslocadas a través del translocón, este proceso está usualmente acoplado con ubiquitinación el cual ocurre en la superficie citosólica de la membrana del RE. Los sustratos ubiquitinados de ERAD son degradados por el proteosoma citosólico 26S (Oberdorf et al. 2001).

Otra de las funciones de las chaperonas de RE, como son calnexina, calreticulina, GRP94, BiP y CaBP1, es el almacenamiento de calcio mediante sus sitios de unión, ya que como se mencionó anteriormente, una de las funciones principales de este compartimento es el almacenamiento de este ión para la señalización intracelular. Mantener los niveles de calcio en RE es esencial para el plegamiento normal en este organelo, ya que el uso de drogas que alteran la concentración de éste ión como tapsigargina o A23187 (ver más adelante), en RE pueden resultar en una dramática y rápida activación de estrés en RE o UPR (ver más adelante) (Booth and Koch 1989; Li et al. 1993).

Las chaperonas que estudiamos en este trabajo fueron Grp78, Grp94, PDI, calnexina, calreticulina y ERp57. Grp78 (proteína regulada por glucosa, pertenece a la familia de hsp70) y Grp94 (proteína regulada por glucosa, pertenece a la familia de hsp90), pertenecen a la familia de las proteínas reguladas por glucosa, porque son inducidas al haber bajos niveles de glucosa y por otros tipos de estrés del RE como: el bloqueo de la N-glicosilación y la variación en los niveles de calcio en este compartimento. Ambas proteínas se encuentran en el lumen del RE y sus genes pueden ser co-regulados transcripcionalmente (Lee 1992; Little et al. 1994). Grp78 se encuentra involucrada en el llamado ciclo Grp78 (ver más adelante) y además posee un papel central en la UPR (ver más adelante).

La calnexina tiene una masa molecular de 90 kDa y la calreticulina de 60 kDa, son lectinas que se unen principalmente a proteínas monoglicosiladas, la primera es una proteína transmembranal tipo II y la segunda se encuentra en el lumen del RE.

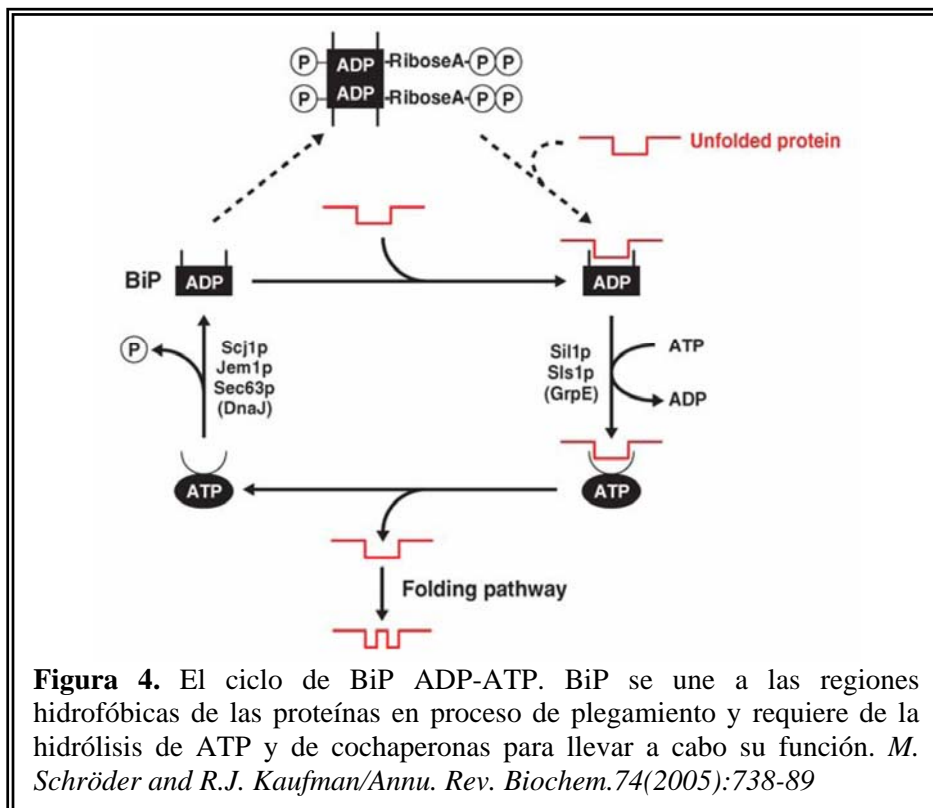
Las enzimas de plegamiento PDI (proteína disulfuro isomerasa) y ERp57, forman, rompen e isomerizan los puentes disulfuro en las proteínas (Freedman 1989; Macer and Koch 1988)

Complejos de plegamiento en RE

Se ha propuesto la existencia de dos complejos multi-proteicos de plegamiento en el RE, (Helenius and Aebi 2004; Ma and Hendershot 2004). Uno de ellos está integrado por Grp78, también conocida como BiP (proteína que se une a la cadena pesada de las inmunoglobulinas), Grp94 o endoplasmina, PDI, CaBP1 (proteína que une calcio 1), ERdj3, ERp72, GRP170, entre otras (Meunier et al. 2002). El segundo sistema, conocido como el “ciclo de calnexina-calreticulina”, está integrado por calnexina, calreticulina y ERp57 (Ellgaard et al. 1999; Hammond and Helenius 1993; Peterson et al. 1995). El hecho de que existan cuando menos dos sistemas en el lumen del RE diferenciables al hacer inmunoprecipitación e inmunotinción, sugiere que este organelo se encuentra compartamentalizado (Kuznetsov et al. 1997; Meunier et al. 2002; Tatu and Helenius 1997) y que estos dos sistemas de chaperonas tendrían preferencia por ciertas proteínas (Molinari and Helenius 2000). Hasta el momento no se sabe cuáles son las características que debe poseer una proteína para ser reconocida por uno u otro sistema, lo que sí se sabe es que algunas proteínas necesitan de la participación de los miembros de ambos sistemas para su plegamiento correcto.

Ciclo Grp78 ADP/ATP

El sistema conocido como el “ciclo de Grp78” funciona reconociendo los residuos hidrofóbicos en las proteínas no plegadas. La unión de BiP a las proteínas no plegadas facilita el plegamiento de las proteínas, manteniéndolas en un estado competente para poder ser plegadas posteriormente (Kaufman 1999; Rao et al. 2002).

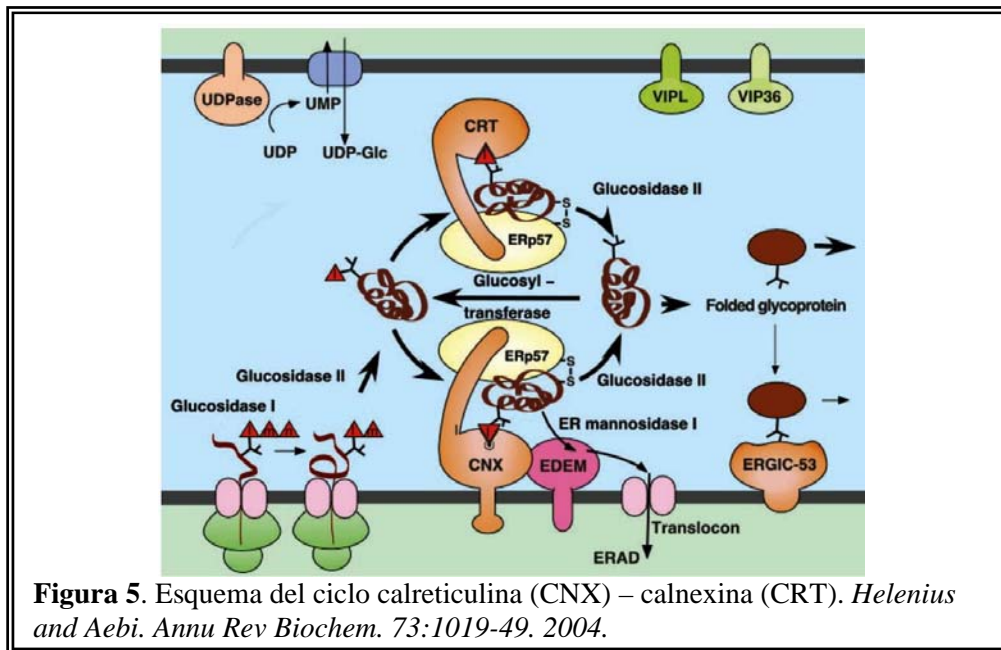


Grp78 posee un dominio de ATPasa en el N-terminal y el sitio de unión a la proteína mal plegada se encuentra en el C-terminal. Su unión con su sustrato está regulado por la hidrólisis de ATP, al igual que todas las proteínas que pertenecen a la familia de las Hsp70 (Kassenbrock and Kelly 1989; Knarr et al. 1999; Liberek et al. 1991).

El tránsito de las proteínas no plegadas a través del ciclo de Grp78 requiere del intercambio de nucleótidos y la hidrólisis de ATP. Además debido a que las chaperonas pertenecientes a la familia de las HSP70s, como lo es Grp78, tienen mayor afinidad por ADP que por ATP, requieren de factores intercambiadores de nucleótidos como son las cochaperonas: DnaJ MATJ1/ERdj1, ERdj3/HEDJ/Scj1p, Erdj4, Erdj5, Sec63p y Jem1p, para catalizar la reacción de intercambio ADP/ATP (Figura 4) (Tyson and Stirling 2000). Anteriormente se mencionó que el ciclo de Grp78 además de incluir a esta proteína, incluía a otras chaperonas moleculares, sin embargo no se muestra la función de éstas en la figura del ciclo de Grp78, debido a que su papel en relación a este sistema no ha sido evaluado.

Ciclo calnexina-calreticulina

El sistema de plegamiento conocido como “ciclo de calnexina-calreticulina”, inicia al transferirse el oligosacárido a la proteína recién sintetizada. La glucosidasa I remueve el primero de los tres residuos de glucosa y, posteriormente la glucosidasa II remueve la segunda glucosa. La calnexina y/o calreticulina reconocen a la proteína monoglicosilada y la exponen a ERp57, una oxido-reductasa que provee asistencia durante la formación de los puentes disulfuro. Cuando la glucosidasa II remueve la glucosa restante, la glicoproteína se disocia de calnexina y/o calreticulina. La proteína ahora puede seguir uno de tres caminos: si está bien plegada ya no es necesario que se le unan las chaperonas, por lo que puede salir del RE y la salida puede ser asistida por lectinas de manosa, tales como ERGIC-53, VIP36 y VIPL; si no está completamente plegada, la glucosiltransferasa UDP-glucosa reglucosila a los glicanos de alta manosa localizados en las regiones mal plegadas y es a través de estos glicanos que la proteína se vuelve a unir a calnexina y/o calreticulina. Alternativamente puede asociarse con el complejo de degradación del RE (ERAD) y la glicoproteína mal plegada se retrotransloca del RE. La degradación de las glicoproteínas ocurre cuando han estado en el lumen del RE por algún tiempo y son reconocidas por la lectina EDEM (por sus siglas en inglés ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein), al perder una manosa por acción de la manosidasa I (Helenius and Aebi 2004) (Figura 5).



Proteínas virales que son plegadas por las chaperonas celulares

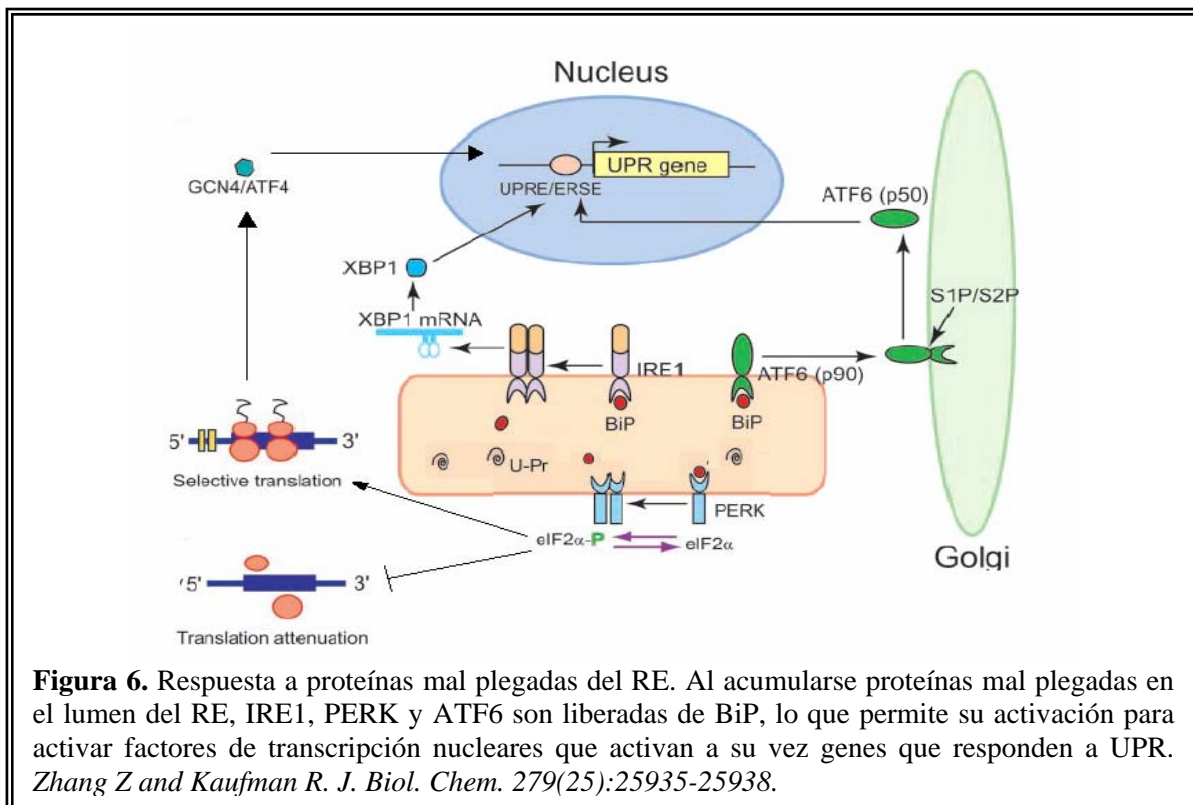
Se ha reportado que algunas proteínas virales requieren de algunas chaperonas moleculares para plegarse y que el virus se ensamble correctamente. Tal es el caso de la proteína HA de influenza, la cual requiere de calnexina y calreticulina para la maduración de esta proteína (Molinari et al. 2004), las glicoproteínas virales de HCV y HBV requieren de calnexina para un plegamiento eficiente (Choukhi et al. 1998), la proteína E1 del virus Sindbis requiere de Grp78 para su plegamiento y para la formación adecuada de sus puentes disulfuro (Mulvey and Brown 1995). Grp78 también está involucrada en el plegamiento de la proteína L de HBV (Cho et al. 2003). La presencia de PDI es importante para se produzca virus infeccioso de polioma de ratón (Gilbert et al. 2006) y la ERp57 es requerida para la salida de la proteína HA de influenza del RE al medio extracelular (Solda et al. 2006).

Respuesta a Proteínas no Plegadas en RE

Condiciones de estrés como la perturbación en la homeostasis del calcio o del estado redox de la célula, la tasa de síntesis elevada de proteínas, la expresión de proteínas no plegadas, la disminución de glucosa, la glicosilación alterada, etc., pueden interferir con el plegamiento normal de las proteínas del RE y dar lugar a la acumulación de éstas.

El RE es el sitio integrador de estas señales y responde mediante patrones de señalización que alteran la transcripción y traducción. Esta respuesta tiene la finalidad de reducir la cantidad de proteínas que se sintetizan y translocan al RE, además de incrementar la degradación de las que ya están en RE. Esta respuesta integral se conoce como Respuesta a proteínas no plegadas (UPR) (Unfolded Protein Response), la cual es percibida y regulada por Grp78. En condiciones normales esta proteína se encuentra unida a tres proteínas IRE1, PERK y ATF6, que funcionan como

efectores de la UPR. Al acumularse proteínas no plegadas en el RE, Grp78 se une a éstas y libera a IRE1, PERK y ATF6, lo que da lugar a su activación (Schroder and Kaufman 2005) (Figura 6).



IRE1. Es un receptor de estrés transmembranral de tipo I localizado en la membrana del RE con un dominio de cinasa hacia el lado citosolico (Cox et al. 1993; Mori et al. 1993). Ire1 se activa en el momento en que Grp78 ya no se une a ella, entonces es capaz de dimerizarse y autofosforilarse para funcionar como RNAsa, la cual corta el RNA mensajero de Xbp1 para remover un intrón de 26 nucleótidos generando un nuevo marco abierto de lectura para la traducción. Este mensajero codifica para una proteína que actúa como un potente activador de la transcripción de genes que tienen en su promotor elementos de respuesta a estrés (ERSE) como son los genes para Grp78, Grp94, calreticulina y EDEM, que son chaperonas residentes del RE y proteínas que intervienen en la degradación de proteínas en el RE.

ATF6 (activating transcription factor 6). Es un factor transcripcional que al activarse es transportado a Golgi, donde es cortado proteolíticamente generando un fragmento de 50KDa que migra al núcleo para activar la transcripción de genes involucrados en la UPR. ATF6 regula a un grupo de genes que poseen la secuencia ERSE en su promotor, que codifican para chaperonas moleculares residentes del RE y genes que codifican para enzimas de plegamiento.

PERK. Es una proteína cinasa que, al ser activada en respuesta a estrés de RE, fosforila al factor de inicio de la traducción eIF2 α , lo que lleva a una severa reducción en la síntesis de proteínas celulares.

ROTAVIRUS

Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años son las enfermedades que causan diarreas. En el 2004, la organización mundial de la salud (World Health Organization WHO) estimó que existen aproximadamente 57,000 muertes ocasionadas por diarrea tan sólo en el continente americano.

Entre los agentes infecciosos que causan diarreas, los rotavirus son uno de los principales causantes de diarreas deshidratantes severas en niños menores de 2 años, principalmente en países en desarrollo (Kapikian et al. 2001), siendo responsables de aproximadamente 600,000 muertes anuales (Parashar 2004). Además, se estima que la infección con rotavirus causa aproximadamente 111 millones de episodios diarreicos, lo que provoca 25 millones de visitas al médico y 2 millones de hospitalizaciones, colocándolo como un problema económico y de salud muy significativo a nivel mundial (Perez-Vargas et al. 2006).

Una vez que el virus infecta a su huésped, el periodo de incubación oscila entre las 24 y las 72 h; la enfermedad causada por este virus dura aproximadamente una semana, y se caracteriza por: diarrea severa, fiebre moderada, vómito y deshidratación. La severidad de la enfermedad varía desde una infección asintomática hasta una gastroenteritis deshidratante severa que puede llevar a la muerte (Kapikian et al. 2001).

Estos virus también son importantes patógenos desde el punto de vista veterinario, ya que infectan becerros, borregos, cerdos y aves jóvenes.

En 1973 Ruth Bishop y colaboradores describieron la presencia de partículas virales de 70 nm de diámetro en biopsias del duodeno de niños con diarrea severa no bacteriana (Bishop et al. 1973). Dado la forma de “rueda” que tienen estos virus posteriormente fueron conocidos como “rotavirus”, del latín *rota* que significa rueda.

Tropismo del virus

Los rotavirus tienen un tropismo por los enterocitos diferenciados localizados en la punta de las microvellosidades del intestino (Bishop et al. 1973). El marcado tropismo celular observado *in vivo* por los enterocitos maduros del intestino delgado ha sugerido que estas células poseen receptores específicos para el virus. Sin embargo, reportes recientes con animales, indican que los rotavirus se pueden dispersar fuera del intestino a otros órganos durante la infección e incluso se han encontrado en sangre (Mossel and Ramig 2003; Ramig 2004).

Debido a las dificultades para cultivar células intestinales diferenciadas, la replicación ha sido estudiada en células de riñón de mono que son altamente susceptibles a la infección por estos virus.

Patogénesis viral

El conocimiento sobre los mecanismos patofisiológicos mediante los cuales rotavirus induce diarrea todavía está incompleto. La patogénesis del virus ha sido estudiada en diferentes especies de animales y el daño provocado por la infección viral varía entre las diferentes especies estudiadas; sin embargo, los cambios patológicos están limitados principalmente a los enterocitos en el intestino delgado.

Los mecanismos que han sido propuestos para explicar la diarrea incluyen el síndrome de mala absorción causada por la muerte de los enterocitos, así como, el efecto tóxico de la proteína no estructural NSP4 y, el hecho de que el sistema nervioso entérico tiene un papel crucial en la secreción de electrolitos en células infectadas con rotavirus.

La mala absorción trae como consecuencia que no se puedan asimilar carbohidratos, grasas y proteínas, además de ser incapaz de absorber suficiente agua, lo que conlleva a la generación de una diarrea osmótica.

Por otra parte, en 1996 se demostró que la proteína no estructural NSP4 es capaz de inducir diarrea en ratones y que esta diarrea es parecida a la enfermedad causada por la infección con rotavirus, esto ha sido confirmado para varias proteínas NSP4 del grupo A y de otros grupos (ver más adelante) (Ball et al. 1996; Horie et al. 1999). El mecanismo de acción de NSP4 como enterotoxina ha sido comprobado al administrar NSP4 a células de la mucosa intestinal de ratón y a líneas celulares intestinales de humano, lo cual resultó en la activación de una cascada de señalización que induce la movilización del calcio intracelular a través de un patrón dependiente de PLC y la secreción de Cl^- (Dong et al. 1997).

Clasificación del virus

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*. No están envueltos por una membrana lipídica, y su genoma está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena que codifican por seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6).

Los rotavirus están divididos genéticamente e inmunológicamente en siete diferentes serogrupos, del A al G (Estes and Graham 1985; Pedley et al. 1983). Un serogrupo está formado por virus que cruzan antigénicamente. Los serogrupos A, B y C incluyen virus encontrados en humanos y animales, mientras que los otros serogrupos D, E, F y G, aparentemente sólo infectan a animales. El grupo A de rotavirus es el grupo más importante epidemiológicamente y, por lo tanto, el que más se ha estudiado; este grupo está clasificado en diferentes serotipos y genotipos basados en las proteínas que forman la capa externa VP4 y VP7. La proteína VP7 está clasificada en 14

serotipos (tipo G) (Hoshino and Kapikian 1994) y la proteína VP4 en 11 serotipos (tipo P) y 19 genotipos (tipos P) (Hoshino and Kapikian 1994; Sereno and Gorziglia 1994).

Estructura del virus

La partícula infecciosa (virión) está formada por tres capas proteicas y, por microscopía electrónica se pueden distinguir tres tipos de partículas. (I) El “core” o nucleocápside del virus está formado por la capa más interna constituida por la proteína VP2, que contiene al genoma viral y a las proteínas VP1 y VP3. (II) Las partículas de doble capa (DLPs, del inglés double-layered particles) están formadas por la proteína VP6 que se ensambla sobre el “core” para formar la capa intermedia del virion. (III) Las partículas infecciosas de triple capa (TLPs, del inglés triple-layered particles) están formadas por las proteínas VP4 y VP7, las cuales se encuentran cubriendo a las DLPs.

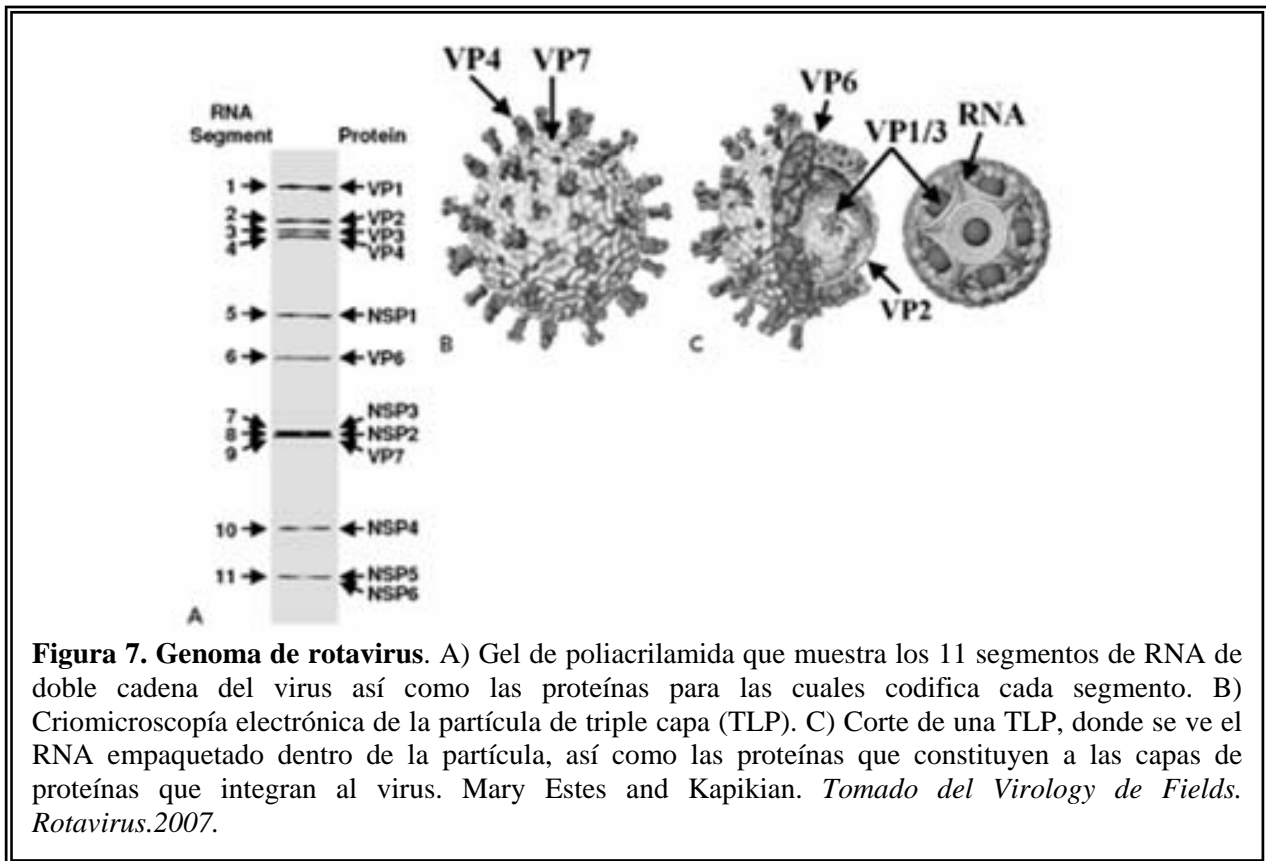
Estudios estructurales de las partículas virales han demostrado que las dos capas más externas del virus presentan una simetría icosaédrica T=13 (Roseto et al. 1979) y, por criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes se ha determinado que el virus posee 60 espículas de aproximadamente 120Å de longitud, que salen de la superficie lisa de la capa externa; éstas están constituidas por dímeros o trímeros de la proteína VP4. La superficie lisa de la capa más externa está formada por 260 trímeros de la glicoproteína VP7.

Las TLPs son sensibles a agentes que quelan calcio como son el EGTA y EDTA (Dormitzer and Greenberg 1992; Shahrabadi and Lee 1986), ya que estas partículas pierden la capa más externa con estos tratamientos por el desensamble de la VP7. Las DLPs pueden perder VP6 al ser tratadas con agentes caotrópicos tales como el tiocianato de sodio (Estes 1996). Las partículas infecciosas son funcionales a pHs desde 3 hasta 9, y los virus son estables por meses a 4°C e incluso a 20°C cuando se estabilizan con calcio.

Genoma Viral

Cada uno de los 11 segmentos de RNA de doble cadena codifica para una proteína, excepto el segmento 11 que codifica para dos proteínas. Los genes virales se transcriben dentro de las DLPs y los RNA mensajeros salen de éstas hacia el citoplasma celular a través de los poros formados por VP2 (Figura 7) (Patton et al. 1997; Patton 2001).

Todos los segmentos de la cadena positiva empiezan con una guanidina 5', seguida por una secuencia conservada que forma parte de la secuencia no codificadora del extremo 5'. Un marco abierto de lectura (ORF) y posteriormente se encuentra otra región no codificadora que termina con dos citidinas en el extremo 3' terminal. Casi todos los RNAs mensajeros terminan con la secuencia consenso 5'-UGUGACC-3', esta secuencia contiene señales importantes para la transcripción y para la replicación del genoma viral (Chasey 1977).



Los genes de rotavirus son ricos en A+U (58% a 67%). Los segmentos de doble cadena están apareados de extremo a extremo, y la cadena positiva que tiene la misma polaridad que el mRNA, tiene un cap formado por $m^7GpppG^{(m)}GPy$ en el extremo 5'. Los genes de rotavirus no se encuentran poliadenilados en el extremo 3' (Imai et al. 1983; McCrae and McCorquodale 1983).

Proteínas de Rotavirus

La mayoría de las proteínas virales (excepto dos) son sintetizadas en los ribosomas libres del citoplasma. La glicoproteína estructural VP7 y la proteína no estructural NSP4 son sintetizadas y glicosiladas en el RE (Estes and Cohen 1989).

Proteínas virales traducidas en los ribosomas libres que se encuentran en el citoplasma

VP1. Es una proteína estructural que se encuentra formando parte del “core”. Está codificada por el gen 1, su masa molecular es de 125 kDa y constituye el 2% de la masa del virión (Fang et al. 1989). Se ha sugerido que esta proteína actúa como RNA polimerasa dependiente de RNA por: 1) tener motivos de RNA polimerasa en su secuencia, 2) por ser un componente de los intermediarios de replicación virales (ver más adelante), y 3) por unirse específicamente a los mensajeros virales en el extremo 3' (Estes and Cohen 1989; Patton and Spencer 2000).

VP2. Está codificada por el gen 2, su masa molecular es de 94 kDa y es la proteína más abundante del “core”. Esta proteína se une tanto al RNA de cadena sencilla como al RNAdc de

forma secuencia inespecífica. Se ha sugerido que está involucrada en el proceso de replicación (Taraporewala and Patton 2004).

VP3. Está codificada por el gen 3, su masa molecular es de 88 kDa. Es una proteína estructura que se encuentra formando parte del “core”. A esta proteína se le atribuye la actividad de guanilil y metil transferasa, ya que tiene motivos estructurales de guanilil transferasas y porque une GTP de modo covalente en una reacción reversible (necesaria para la síntesis de mRNA maduros) (Liu et al. 1992; Patton et al. 1997; Patton and Spencer 2000; Vasquez et al. 1993).

VP4. Está codificada por el gen 4, su masa molecular es de 88 kDa y forma parte de las espículas que sobresalen del virus (Prasad et al. 1990). VP4 está implicada en varias funciones importantes del ciclo viral, tales como la unión del virus a la célula huésped, la fusión del virus en la célula, la hemaglutinación de los eritrocitos, y neutralización del virus por anticuerpos dirigidos contra esta proteína (Estes and Cohen 1989; Ludert et al. 1996). El corte de VP4 por tripsina produce dos péptidos de menor tamaño, VP5 (60 kDa) y VP8 (28 kDa), con lo que se aumenta la infectividad de las partículas virales. Aunque el corte con tripsina se requiere para la infectividad del virus, éste no es necesario para la unión del virus con la célula huésped (Estes and Cohen 1989).

VP6. Está codificada por el gen 6, su masa molecular es de 41 kDa y es la proteína más abundante de la cápside. Esta proteína interacciona con VP2 hacia el interior de la partícula y, hacia el exterior, con VP4 y VP7 (Charpilienne et al. 2002). Estudios bioquímicos y análisis cristalográficos, demuestran que la proteína VP6 se encuentra en forma de trímeros rodeando a los “cores” (Gorziglia et al. 1985; Prasad et al. 1988). VP6 es esencial para la actividad de transcriptasa, pero no para la replicación (Charpilienne et al. 2002; Gilber et al. 2001; Patton et al. 1996). Durante una infección, VP6 se localiza en asociación con viroplasmos (ver más adelante). VP6 es altamente inmunogénica, por lo que es la proteína blanco más frecuente en ensayos de diagnóstico para detectar a estos virus (Estes and Cohen 1989).

NSP1. Está codificada por el gen 5. Posee un motivo tipo dedo de zinc similar al de factores de transcripción eucarióticos, el cual es requerido para su unión específica con los mRNA virales (Patton 1995). NSP1 interacciona con múltiples miembros de la familia de interferón, incluyendo IRF3, IRF5 y IRF7 e induce la degradación mediada por proteosoma (Barro and Patton 2007).

NSP2. Está codificada por el gen 8, su masa molecular es de 35 kDa y se autoensambla en octámeros formados por las interacciones de dos tetrámeros (Jayaram et al. 2002). Los octámeros poseen actividad de unión a RNA de cadena sencilla, y son capaces de desestabilizar RNA de doble cadena (Taraporewala et al. 1999b). Además los octámeros poseen actividad nucleósido trifosfato fosfohidrolasa (NTPasa) (Taraporewala et al. 1999a), la cual es esencial para la

replicación del genoma (Taraporewala et al. 2006). Además, NSP2 forma parte de los intermediarios de replicación (ver más adelante).

NSP3. Está codificada por el gen 7, su masa molecular es de 32 kDa. Esta proteína se une a los mensajeros virales en el extremo 3', a través del amino terminal. Además interacciona específicamente con una alta afinidad con el factor de inicio de la traducción eIF4G a través de su dominio carboxilo terminal, en la misma región que la proteína celular de unión a poli-A (PABP); es por ello que se ha propuesto que, durante la infección con rotavirus, NSP3 evita que PABP se una a eIF4G impidiendo así la traducción de los mRNA celulares (Piron et al. 1998). Sin embargo, NSP3 no se requiere para la traducción de los mensajeros virales (Montero et al. 2006).

NSP5. Está codificada por el gen 11, su masa molecular está entre 26 kDa y 34 kDa, es una fosfoproteína O-glicosilada, aunque aún se desconoce la función de estas modificaciones postraduccionales (Afrikanova et al. 1996; Blackhall et al. 1998; Gonzalez and Burrone 1991). NSP5 interactúa con VP1, VP6, NSP2, NSP3 y NSP6 y, se une inespecíficamente a RNA de cadena sencilla y de doble cadena (Berois et al. 2003; Eichwald et al. 2004). La interacción de NSP5 con NSP2 permite la formación de estructuras parecidas a viroplasmos (ver más adelante), por lo que se ha propuesto que esta proteína tiene función de andamiaje en la formación de viroplasmos (Fabbretti et al. 1999).

Proteínas virales traducidas en RE

Como se mencionó anteriormente, las dos glicoproteínas virales que son traducidas en el RE, VP7 y NSP4, son muy importantes para el proceso de morfogénesis del virus, por lo que sus principales características se describen a continuación:

VP7. Está codificada por el gen 9 en el grupo A de rotavirus, su masa molecular es de 37 kDa y es la proteína más abundante de las dos que integran la capa externa del virión maduro (Estes and Cohen 1989). VP7 es altamente inmunogénica, induce anticuerpos neutralizantes y específicos de serotipo (Hoshino and Kapikian 1994).

El gen de VP7 contiene dos codones de iniciación en fase y cada uno de ellos está precedido por dominios hidrofóbicos llamados H1 y H2 (Figura 8). Estos dominios hidrofóbicos forman parte del péptido señal que dirige a VP7 al RE para su traducción. Durante la inserción de VP7 al RE, el péptido señal se corta en la Gln 51 (Stirzaker and Both 1989). Mediante estudios bioquímicos, se ha determinado que VP7 es una proteína asociada a membrana con una orientación luminal en el RE (Ericson et al. 1983; Kabcenell and Atkinson 1985).

Se ha descrito que VP7 posee dos señales para la retención en el RE, entre los aminoácidos 51-61 y 62-111 (Whitfeld et al. 1987), diferentes a la secuencia KDEL presente en muchas de las proteínas celulares residentes del RE (Munro and Pelham 1987). También se ha encontrado que

tres aminoácidos (ITG) en el extremo amino terminal son críticos para su retención en el lumen del RE (Maass and Atkinson 1994).

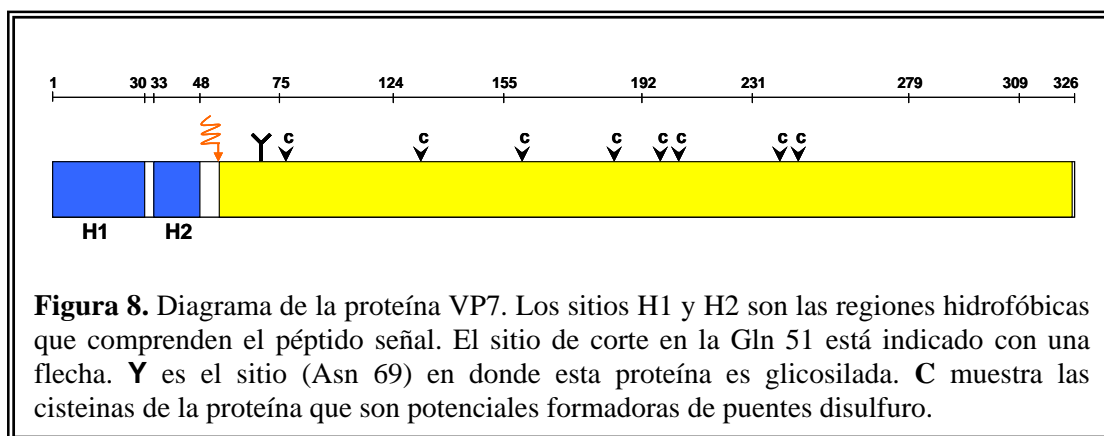


Figura 8. Diagrama de la proteína VP7. Los sitios H1 y H2 son las regiones hidrofóbicas que comprenden el péptido señal. El sitio de corte en la Gln 51 está indicado con una flecha. Y es el sitio (Asn 69) en donde esta proteína es glicosilada. C muestra las cisteínas de la proteína que son potenciales formadoras de puentes disulfuro.

Esta proteína se N-glicosila co-traduccionalmente con cadenas de oligosacáridos de alta manosa en una o dos posiciones (más comúnmente en una sola posición, en la Asn 69), dependiendo de la cepa de rotavirus. En células infectadas se han detectado dos formas de unidades de oligosacáridos de VP7, $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$ y $\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$ (Kabcenell and Atkinson 1985). Aunado a esto se ha demostrado que una proporción de la VP7 ensamblada sobre el virus maduro es procesada a $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$ (Kabcenell and Atkinson 1985). Como se mencionó anteriormente, la enzima responsable del procesamiento de los oligosacáridos para producir $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$ está localizada en el compartimiento del cis-Golgi, sugiriendo que la cadena de azúcares de VP7 que componen al virus maduro en un compartimiento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi, y que la VP7 con una cadena de oligosacáridos procesada de manosa 9 a manosa 6 regresa al RE debido a sus señales de retención, de forma similar a las proteínas con señal KDEL, las cuales regresan al RE desde las regiones pre-Golgi o cis-Golgi (Munro and Pelham 1987; Pelham 1991). El análisis del procesamiento de los oligosacáridos de VP7 ha revelado que este proceso dura aproximadamente 90 minutos, y se ha descrito que la glicosilación de VP7 es esencial para el plegamiento correcto y para la formación de los puentes disulfuro en esta proteína (Mirazimi and Svensson 1998).

Los puentes disulfuro son también importantes para la maduración y plegamiento correcto de VP7 y para el ensamblaje de las partículas virales (Dormitzer and Greenberg 1992; Svensson et al. 1994), los cuales para su formación adecuada requieren de ATP (Mirazimi and Svensson 2000). El calcio es crítico para la estabilidad y la infectividad de las partículas virales (Cohen and Dobos 1979). Se ha demostrado que iones de calcio libres afectan la conformación de VP7 (Dormitzer and Greenberg 1992). Se ha sugerido que dos residuos de prolina, en las posiciones 75 y 279 son esenciales en la unión de calcio a VP7 (Gajardo et al. 1997). La primera prolina se localiza en una región de alta variabilidad, en contraste, la prolina 279 se localiza en una región conservada entre todas las VP7 (Gajardo et al. 1997).

Durante la infección, VP7 se encuentra en el RE y por ensayos de inmunofluorescencia da la apariencia de formar estructuras semicirculares que rodean a los viroplasmos (ver más adelante) y, colocaliza con NSP4 y VP4 (Gonzalez et al. 2000).

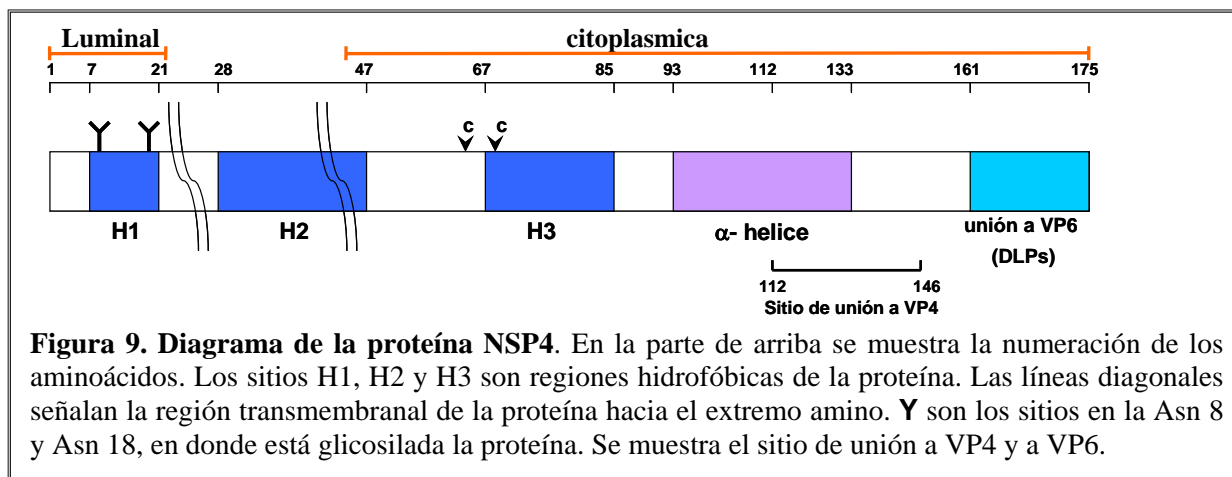
Mediante el silenciamiento específico de esta proteína, a través de siRNA, se ha determinado que durante la morfogénesis, VP7 es importante para que se lleve a cabo la remoción de la membrana lipídica que envuelve a las partículas intermediarias (ver más adelante) (Lopez et al. 2005).

Se ha observado que en el RE de células infectadas con la cepa de simio SA11 existen dos pozas de VP7 que pueden ser distinguidas utilizando dos anticuerpos distintos (Kabcenell et al. 1988). En una poza se encuentran solamente las partículas ensambladas y es detectada por un anticuerpo monoclonal neutralizante. La segunda poza de VP7 está asociada a la membrana plasmática del RE en forma desnaturalizada y se detecta con un anticuerpo policlonal contra VP7 (Kabcenell et al. 1988). La distinción entre estas dos formas de VP7 permitió hacer un estudio de la cinética de ensamble de VP7 y de otras proteínas estructurales en las partículas. Se encontró que VP4 y VP7 aparecen en las TLPs maduras entre los 10 y 15 minutos después de que las DLPs geman al RE. Una cinética de análisis del procesamiento de los oligosacáridos en las dos pozas de VP7, mostró que el procesamiento de los oligosacáridos de la VP7 asociada al virus tienen 15 min de retraso, comparado con el de los oligosacáridos de la VP7 que está asociada a la membrana, sugiriendo que la VP7 de membrana es un precursor de la que se encuentra en el virus. Este retraso en el procesamiento de los oligosacáridos de la VP7 parece representar el tiempo que requiere el virus para gemar y ensamblar la capa externa (Kabcenell et al. 1988).

NSP4. Está codificada por el gen 10, y está modificada por dos N-glicosilaciones tipo alta manosa en el extremo amino (Asn 8 y Asn 18) (Figura 9)(Estes and Cohen 1989), las cuales toman aproximadamente 120 minutos en procesarse a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Kabcenell and Atkinson 1985). Inicialmente, el producto de la traducción de NSP4 es de 20 kDa y al glicosilarse se convierte en una especie de 29 kDa que, con el procesamiento, cambia su masa molecular a 28 kDa (Ericson et al. 1982; Kabcenell and Atkinson 1985). Los carbohidratos en NSP4 son sensibles al tratamiento con endoglicosidasa H por poseer oligosacáridos de tipo alta manosa con $\text{Man}_8\text{Glc}_2\text{NAc}$; ésto además indica que no ocurre un procesamiento adicional en el Golgi. Adicionalmente, se ha determinado que la glicosilación de NSP4 es importante para el plegamiento y el ensamble de virus infecciosos (Petrie et al. 1983).

NSP4 posee tres regiones hidrofóbicas hacia el amino terminal, H1, H2 y H3. Esta proteína se inserta en la membrana del RE y no es procesada por la peptidasa señal (Figura 9) (Ericson et al. 1983). La secuencia para retención en el RE se encuentra entre los aminoácidos 85 – 123 del

lado citoplásmico de NSP4 (Mirazimi and Svensson 2000) y se sabe que, no es la típica KDEL de las proteínas celulares, ni el ITG de VP7 (Chan et al. 1988).



NSP4 ha sido encontrada como dímeros y, en la membrana del RE se encuentra predominantemente en forma de tetrámeros (Maass and Atkinson 1994). Se ha sugerido que su oligomerización es mediada por una estructura α -hélice en el dominio citoplásmico (Taylor et al. 1996). El extremo amino de NSP4 es intramembranal, mientras que el extremo carboxilo tiene una disposición citoplásmica (Chan et al. 1988). En la parte citoplásmica de NSP4 se han mapeado dominios de interacción con VP6, presente en las DLPs (aa 161-175, en el extremo carboxilo) (Au et al. 1993), y con VP4 (aa 112-148) (Figura 9).

Durante la morfogénesis del virus, NSP4 sirve como receptor intracelular para la gemación de las DLPs al lumen del RE, en donde se lleva a cabo la maduración del virus (ver más adelante) (Au et al. 1989; Meyer et al. 1989). La idea de que NSP4 es el receptor de las DLPs es apoyada por el hecho de que las DLPs se unen solamente a membranas que contienen NSP4 (Au et al. 1988; Au et al. 1989). Se sabe además que, la glicosilación de NSP4 no se requiere para que se puedan unir las DLPs, pero sí se requiere para que se dé la interacción de NSP4 con calnexina (Au et al. 1993; Mirazimi and Svensson 1998).

La inhibición de la expresión de NSP4, utilizando siRNAs altera la distribución celular de otras proteínas virales, así como la formación de viroplasmos, en donde la replicación del virus ocurre, y también modula la síntesis del mRNA viral, lo que sugiere que NSP4 participa en la replicación del genoma viral (Lopez et al. 2005; Silvestri et al. 2005).

Resultados recientes indican que existen al menos tres pozas de NSP4 en células infectadas dependientes del nivel de expresión de la proteína NSP4 (Berkova et al. 2006). La primera poza está representada por la NSP4 localizada en la membrana del RE la cual está presente a través del curso de la infección. Esta poza sirve como receptor para la gemación de las DLPs a través del RE en el pico de la infección viral cuando todas las proteínas virales son abundantes (después de las 6 hpi). La segunda poza de NSP4 la constituyen las moléculas que entran al compartimento de

ERGIC para ser recicladas al RE o, tal vez, como parte de un patrón de secreción no clásico para la liberación y el corte de un péptido de NSP4 a los primeros tiempos post-infección (Zhang et al. 2000); ésto ocurre cuando los niveles de las proteínas virales son relativamente bajos. La tercera poza de las moléculas de NSP4, se distribuye en estructuras vesiculares en el citoplasma asociadas con el marcador autofagosomal LC3 y con viroplasmos; esta poza está regulada por los niveles de calcio y aparece a las 6 hpi, cuando hay un incremento en el nivel de calcio intracelular por el aumento en la expresión de las proteínas virales (Michelangeli et al. 1991).

Ciclo Viral

Para la elaboración de este trabajo utilizamos células de riñón de mono MA104, las cuales son un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los rotavirus. La síntesis de proteínas virales es detectada desde las 2 hpi, la traducción de la síntesis de proteínas celulares disminuye importantemente a las 4 hpi y el proceso de ensamble se aprecia desde las 6 hpi, produciéndose un máximo de partículas virales a las 12 hpi a 37°C, al infectar con una MOI de 3.

Unión y entrada del virus a la célula

Como se mencionó anteriormente, las proteínas que integran la capa externa del virus, VP4 y VP7, están involucradas en las primeras interacciones con la célula huésped. El paso inicial para la infección del virus consiste en la unión del virus con los receptores en la superficie celular. Se sabe que es necesario que VP4 se corte con tripsina, dando lugar a VP8 (1 al 247 aa) y VP5 (248 al 776 aa), que permanecen asociados al virión (Estes et al. 1981). La unión inicial del virus con la célula huésped es también a través de VP4 (Crawford et al. 1994; Ruggeri and Greenberg 1991).

Se ha propuesto que la entrada de rotavirus es un proceso que consiste de múltiples interacciones secuenciales con varios ligandos, las cuales provocan cambios conformacionales en las proteínas de la cápside. Para algunas cepas (dependientes de siálico), la interacción inicial se da entre VP8 y un receptor que contiene ácido siálico. Se piensa que esta interacción induce cambios conformacionales en VP4 lo cual permite que posteriormente el virus interactúe con la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través de VP5. Las interacciones post-unión involucran a las proteínas virales VP5 y VP7 que se unen a la proteína celular de choque térmico (Hsp70) y a integrinas tales como: $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, y $\alpha 4\beta 1$, dependiendo de la línea celular de la que se trate (Coulson et al. 1997; Hewish et al. 2000; Lopez and Arias 2004; Zarate et al. 2000).

No está claro si el mecanismo de internalización del virus se da por endocitosis o por penetración directa, ya que ambos se han sugerido como mecanismos de entrada a la célula (Estes 2001). Lo que está claro es que una vez que el virus se internaliza, pierde la capa externa y las partículas de doble capa inician la transcripción viral.

Transcripción y Replicación

La síntesis de los transcritos de rotavirus la realiza una RNA polimerasa viral. El RNA viral producido puede tener dos destinos, por un lado puede funcionar como mRNA que dirige la traducción de las proteínas virales y, por otro lado, puede servir como templado para la producción del RNA genómico.

La replicación del virus y el inicio de la morfogénesis se llevan a cabo en estructuras conocidas como viroplasmatas (Figura 10). Los viroplasmatas son estructuras electrodensas al observarlas al microscopio electrónico; en estos sitios se acumulan las proteínas y el RNA viral para formar intermediarios de replicación (Estes and Cohen 1989). Se ha propuesto que los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial compuesto por las proteínas virales VP1 y VP3. Posteriormente, a éste complejo se le unen las proteínas VP2, NSP2 y NSP5, y los 11 mRNAs virales, y es en este complejo en donde se replican los RNAs virales. Al terminar la replicación, las proteínas NSP2 y NSP5 se disocian, y la proteína VP6 se ensambla, dando lugar a las DLPs.

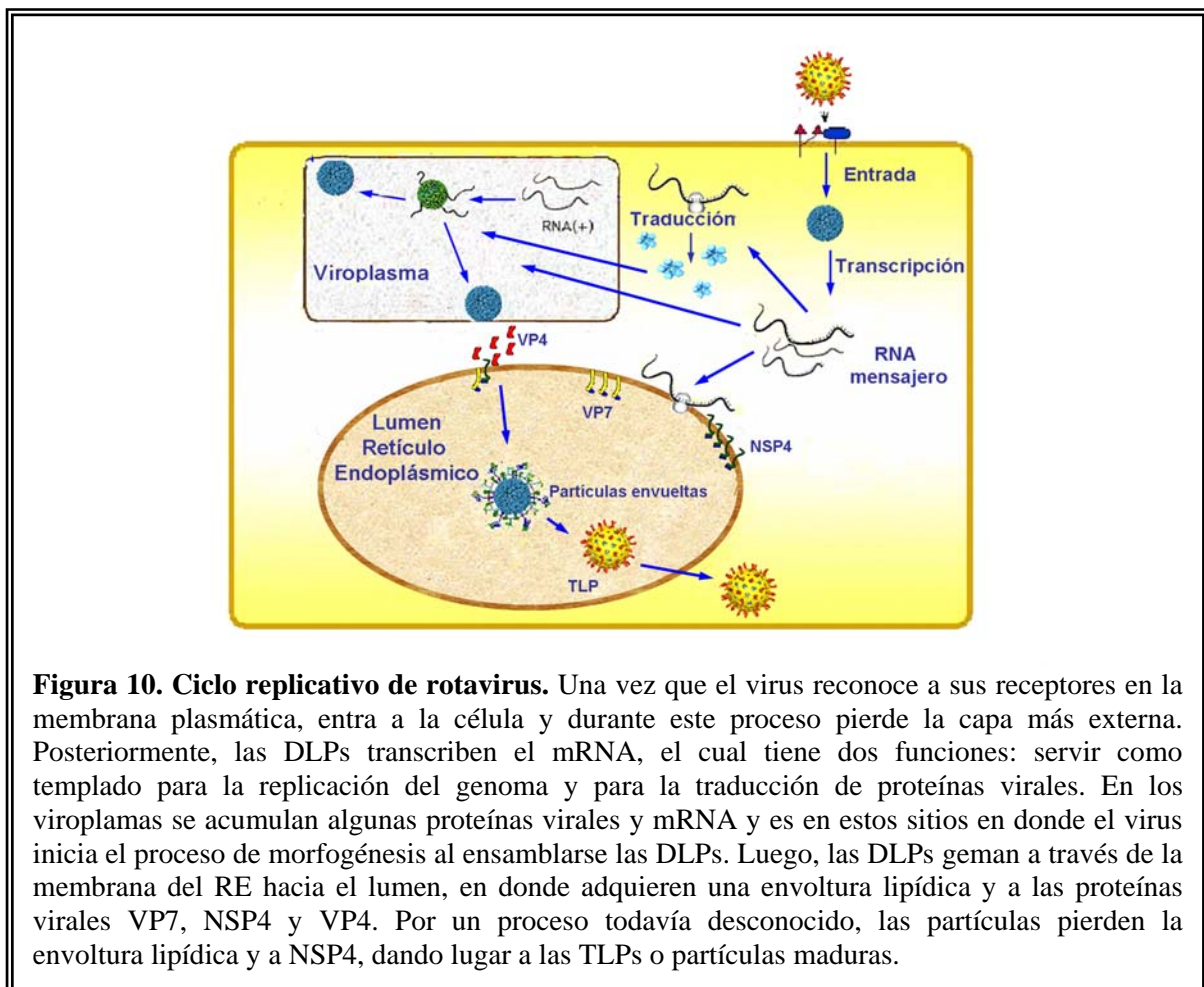


Figura 10. Ciclo replicativo de rotavirus. Una vez que el virus reconoce a sus receptores en la membrana plasmática, entra a la célula y durante este proceso pierde la capa más externa. Posteriormente, las DLPs transcriben el mRNA, el cual tiene dos funciones: servir como templado para la replicación del genoma y para la traducción de proteínas virales. En los viroplasmatas se acumulan algunas proteínas virales y mRNA y es en estos sitios en donde el virus inicia el proceso de morfogénesis al ensamblarse las DLPs. Luego, las DLPs geman a través de la membrana del RE hacia el lumen, en donde adquieren una envoltura lipídica y a las proteínas virales VP7, NSP4 y VP4. Por un proceso todavía desconocido, las partículas pierden la envoltura lipídica y a NSP4, dando lugar a las TLPs o partículas maduras.

Plegamiento y morfogénesis viral

Como se mencionó, el ensamble de las DLPs comienza en los viroplasmatas, posteriormente éstas geman hacia el lumen del RE, cuya membrana está modificada con las glicoproteínas virales

VP7 y NSP4 (Gonzalez et al. 2000; Petrie et al. 1982). Las DLPs son reconocidas por NSP4, que actúa como receptor para que puedan atravesar la membrana del RE (Lopez et al. 2005), al gemar las DLPs quedan envueltas con membrana del RE que contiene VP4, VP7 y NSP4 (Poruchynsky et al. 1991).

Como etapa final de la morfogénesis del virus, las partículas envueltas presentes en el lumen del RE, pierden por un mecanismo desconocido la envoltura lipídica y, a NSP4, produciendo el virión maduro de triple capa.

Liberación del virus

Estudios de microscopía electrónica han demostrado que el ciclo de infección termina cuando la progenie viral es liberada de la célula huésped por lisis en células no polarizadas como las MA104 (Altenburg et al. 1980; Chasey 1977; McNulty et al. 1976). A pesar de la lisis celular, muchas partículas virales permanecen asociadas a restos celulares, lo que sugiere que estas partículas interactúan con estructuras celulares. Se han sugerido interacciones con las membranas celulares y el citoesqueleto (Musalem and Espejo 1985), y los procedimientos de purificación del virus generalmente emplean extracción con freón para liberar a las partículas de los restos celulares. El citoesqueleto podría actuar como un soporte que las proteínas y partículas virales emplean como transporte a sitios discretos en la célula para el ensamble, o como elemento estabilizador de los viriones en el sitio de ensamble. Las interacciones de VP4 con actina y las balsas lipídicas, pueden remodelar microfilamentos, por lo que se ha sugerido como mecanismo por el cual las microvellosidades de la membrana de células epiteliales polarizadas son desestabilizadas para facilitar la salida del virus de la célula (Gardet et al. 2006).

ANTECEDENTES

Se ha visto que varios tratamientos que inhiben o modifican la glicosilación de las proteínas virales NSP4 y VP7, o que alteran la concentración de calcio en el RE, afectan la morfogénesis del virus.

Tratamientos de las células con brefeldina A (la cual tiene como blanco un factor intercambiador de GTP, que activa a la GTPasa llamada Arf1p involucrada en la formación de vesículas transportadoras, lo que trae como consecuencia el bloqueo del transporte de proteínas del RE al complejo de Golgi y causa el rompimiento de este último, relocalizando las proteínas residentes del Golgi al RE) tiene un efecto pronunciado sobre la producción de la progenie viral, reduciéndola en un 99.9%. El tratamiento con esta droga interfiere con el procesamiento de oligosacáridos de las proteínas virales, ocasionando que la VP7 que se encuentra en el lumen del RE se pliegue mal, lo que produce su agregación mediante puentes disulfuro (Mirazimi et al. 1996). Un efecto similar se obtiene al tratar a las células infectadas con tunicamicina (que es un inhibidor de la N-glicosilación). El tratamiento tanto con tunicamicina como con brefeldina A, causa que se acumulen las partículas intermediarias envueltas de doble capa, bloqueando su maduración a partículas maduras (Mirazimi et al. 1996). Estos resultados sugieren que la glicosilación es importante para la formación correcta de los puentes disulfuro en VP7. Adicionalmente se sabe que la VP7 glicosilada puede interactuar con PDI, la cual es una disulfuro isomerasa, por lo que podría estar rearrreglando los puentes disulfuro de VP7 (Mirazimi and Svensson 1998).

La actividad de ciertas chaperonas de RE depende de la hidrólisis de ATP, por lo que el hecho de que en ausencia de ATP no se formen los puentes disulfuro de VP7, sugiere que algunas chaperonas están involucradas en el plegamiento de VP7 (por ej., Grp78, Grp94) y/o posiblemente la proteína disulfuro isomerasa (Mirazimi and Svensson 2000).

También se ha observado que agentes farmacológicos que reducen los niveles de calcio en el RE, tales como el ionóforo de calcio A23187 y la tapsigargina (un inhibidor de la ATPasa de calcio del RE) (Li et al. 1993; Resendez E Jr et al. 1985) inhiben la formación de partículas virales infecciosas. Estos agentes provocan la acumulación de las partículas intermediarias cubiertas con membrana lipídica, evitando que se generen los viriones maduros, de manera similar a lo observado con tunicamicina o brefeldina A. Se ha visto que la disminución de Ca^{2+} en el RE afecta la glicosilación de las proteínas NSP4 y VP7, impidiendo el ensamble de la tercera capa y la remoción de la membrana lipídica (Michelangeli et al. 1995). En presencia de tapsigargina, la VP7 sufre un cambio conformacional, evidenciado por la falta de reconocimiento por un anticuerpo monoclonal, y no forma heterotrímeros con VP4 y NSP4 (Poruchynsky et al. 1991).

Existen también otros antecedentes que sugieren que las chaperonas del RE podrían ser importantes en la morfogénesis del virus. Se ha reportado que el nivel de RNA mensajero y de proteína de los genes Grp78 y Grp94 aumentan marcadamente en células MA104 infectadas con rotavirus (Cuadras et al. 2002; Xu et al. 1998). Adicionalmente, en el trabajo desarrollado durante mi maestría detecté mediante PCR en tiempo real, que en células MA104 y Caco2 infectadas con rotavirus hay un aumento en los niveles de RNA mensajero (del orden de 100 veces) de los genes que codifican para las chaperonas moleculares Hsp70, Grp94 y Grp78, en comparación con células no infectadas (ver resultados adicionales pag. 132 [Anexo II]). Finalmente, y en apoyo a lo anterior, se ha descrito que las chaperonas Grp78 y Grp94 podrían interactuar directamente con polipéptidos estructurales de rotavirus (Xu et al. 1998). De la misma forma, se ha descrito que PDI interacciona con NSP4 en su forma no glicosilada y con VP7 glicosilada, además de que calnexina interacciona con NSP4 glicosilada, lo que sugiere que estas proteínas podrían actuar como chaperonas y enzimas plegadoras en el proceso de maduración de rotavirus en el lumen del RE (Mirazimi and Svensson 1998).

HIPÓTESIS

Algunas chaperonas del RE tienen un papel importante en el plegamiento correcto de las proteínas VP7 y NSP4 de los rotavirus y en el ensamble de las partículas virales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de las chaperonas moleculares en la morfogénesis de rotavirus.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✿ Silenciar la expresión de las chaperonas Grp78, Grp94, calnexina, PDI, calreticulina y ERp57 mediante RNA de interferencia y evaluar si la ausencia de alguna de ellas tiene algún efecto sobre la expresión de las otras.
- ✿ Caracterizar el efecto de la ausencia de las chaperonas moleculares en la distribución intracelular de las proteínas virales y celulares.
- ✿ Caracterizar el efecto del silenciamiento de las chaperonas en la morfogénesis del virus, así como en la producción de progenie viral.
- ✿ Analizar el efecto que tiene el silenciamiento de cada uno de los genes de las chaperonas sobre el patrón de glicosilación y el plegamiento de las proteínas virales NSP4 y VP7.

MATERIALES Y METODOS

Células, Virus y Anticuerpos

La línea celular MA104, derivada de células epiteliales de riñón de mono verde, fue crecida en medio mínimo Advanced (Gibco) suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS). Los rotavirus RRV y SA11, que son cepas de simio, fueron donados por H. B. Greenberg (Universidad de Stanford, Palo Alto, CA). La cepa mutante de SA11 (Clona 28) fue donada por K. Estes (Baylor College of Medicine, Houston, Texas). Los virus fueron propagados en células MA104 como se ha descrito previamente (Pando et al. 2002). Los anticuerpos monoclonales (MAbs) utilizados en este estudio incluyen los MAb 255/60 (VP6) y MAb M60 (VP7), los cuales fueron donados por el Dr. H. B. Greenberg, el último de estos anticuerpos reconoce un epítopo no neutralizante de VP7 y es dependiente de la formación de los puentes disulfuro correctos en VP7 (Svensson et al. 1994). El suero de ratón dirigido contra NSP4 (c-239) fue producido en nuestro laboratorio. Los anticuerpos policlonales contra las partículas purificadas de triple capa (TLPs), la proteína NSP5 y la proteína vimentina (recombinante), fueron producidos en conejos como se ha descrito previamente (Gonzalez et al. 1998). Los anticuerpos para las chaperonas moleculares fueron: Grp94, calnexina y PDI (Affinity BioReagents); calreticulina, ERp57 y anti-KDEL (Stressgen Biotechnologies). Grp78 fue detectada con el anti-KDEL. Como anticuerpos secundarios se utilizaron: Anti IgG de ratón en cabra acoplado a Alexa 568, cabra anti-ratón IgG acoplado a Alexa 488, cabra anti-rata IgG acoplado a Alexa 488, cabra anti-conejo IgG acoplado a Alexa 568 y cabra anti-conejo acoplado a Alexa 488 que fueron adquiridos de Molecular Probes (Eugene, OR). Suero policlonal de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa fue de Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA), y suero policlonal de conejo anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa de Zymed.

Transfección de los siRNAs

Para silenciar a las chaperonas moleculares se diseñaron 4 siRNAs para silenciar la expresión de Grp78, 2 siRNAs para Grp94, 2 siRNAs para calnexina y, para interferir la expresión de PDI utilizamos un siRNA previamente reportado (Sullivan et al. 2003). Para silenciar la expresión de calreticulina y ERp57 utilizamos mezclas de 4 interferentes prediseñados y probados (siGenome Smartpool de Dharmacon). La secuencia y las posiciones relativas de los siRNAs diseñados se muestran en la Tabla 1. Todos los siRNAs fueron sintetizados en Dharmacon Research (Lafayette, Colo.). Como controles negativos se utilizaron un siRNA para silenciar la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), previamente reportado (Lopez et al. 2005), y un interferente comercial contra la proteína luciferasa (Dharmacon).

La transfección de los siRNAs se llevó a cabo en monocapas de células MA104 sembradas en placas de 48 pozos y/o en frascos de 25 cm² (F25) a una confluencia de 80%, las cuales fueron

transfectadas con 100 µl o 1000 µl, respectivamente, de una mezcla que contenía 60 µg/ml de oligofectamina (Invitrogen) y la cantidad de cada uno de los siRNAs indicada en la Tabla 1, diluidos en MEM sin suero. La mezcla de transfección se agregó a las células que fueron previamente lavadas con MEM y se incubaron por 8 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se retiró la mezcla de transfección y las células fueron mantenidas en MEM sin suero y sin antibióticos por 16 h a 37°C, posteriormente, las células fueron lavadas nuevamente y se incubaron en MEM con suero por 48 h a 37°C.

TABLA 1. Secuencias y posiciones de los siRNA diseñados contra las chaperonas moleculares.

siRNA	Concentración usada pmol/ml	Posición	Secuencia sentido	Inhibición relativa ^a
Grp94-1	600	119-139	AAG GAU CAA GGA CGG AUG AUG	++
Grp94-2*	300	236-256	AAG CCG AAG UUA ACA GAA UGA	+++
Grp78-1	300	352-372	AAG GUG GUU GAA AAG AAA ACU	++
Grp78-2*	300	460-480	AAA GAA ACC GCU GAG GCU UAU	+++
Grp78-3	300	652-672	AAG AAC AUC CUG GUG UUU GAC	-
Grp78-4	150	310-330	AAU GAC CCG UCU GUG CAG CAG	+
calnexin-1*	600	169-189	AAG GUU ACU UAC AAA GCU CCA	+++
calnexin-2	600	119-139	AAG AGG UAG AAG ACU CAA AAC	-
PDI ^b	600		AAC AAC UUU GAA GGG GAG GUC	+++
GFP ^b	300		AAC UUA CCC UGA AGU UCA UCU	-

^a Inhibición relativa del nivel de proteína al compararlo con células transfectadas con el siRNA irrelevante. +++, >70%; ++, 50%; +, <25%; -, sin efecto.

* siRNA más efectivo para silenciar la expresión de estos genes.

^b Las secuencias de siRNA para PDI y GFP, han sido previamente reportadas (Lopez et al. 2005; Sullivan et al. 2003).

Infección de las células y titulación de la progenie viral

Las células transfectadas fueron infectadas con RRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 durante 1 h a 37°C, las células se lavaron dos veces con MEM sin suero y la infección se dejó proseguir a 37°C por los tiempos indicados.

Para calcular el título de la progenie viral, las células fueron lisadas a las 14 horas post-infección (hpi), congelando y descongelando dos veces, y los lisados fueron tratados con 10 µg/ml de tripsina por 30 min a 37°C para activar la infectividad del virus antes de titularlo. El título del virus infeccioso se obtuvo haciendo diluciones seriadas del lisado, iniciando de la dilución de 1:100. Estas diluciones del virus se utilizaron para infectar durante 1 h a 37°C monocapas de células

MA104 en placas de 96 pozos. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con MEM para retirar el virus excedente y se dejó proseguir la infección por 14 h a 37°C. Después de esta incubación se retiró el medio de cultivo, y las células se fijaron con acetona al 80% durante 30 min; posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubó con una dilución 1:300 de un suero contra TLPs durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una dilución 1:3000 de proteína A peroxidasa (Amersham-Pharmacia Biotech) en PBS. Las células infectadas se tiñieron con 3-amino-9-etil-carbazole (Sigma) como sustrato para la peroxidasa. La determinación del título viral se llevó a cabo contando las células teñidas (focos infecciosos); se utilizó la siguiente formula: Número de focos X el inverso de la dilución X 4.5 X 20 (factor de volumen de 50 µl) = unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (uff/ml).

Inmunodetección en membrana

Las células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs y 72 h post-transfección se lisaron con el amortiguador de carga de laemmli (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% de azul de bromofenol, 10% glicerol y 1% β-mercaptoetanol). Los lisados se hirvieron por 5 min antes de separar a las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las proteínas así separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) durante 1 h a 130 mA, en amortiguador CAPS (10 mM pH 11), empleando el modulo de transferencia Mini Trans-Blot (BioRad). Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente (TA) con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS con Tween 0.1% (PBS-Tween) y, posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en PBS-Tween. Las membranas se lavaron 4 veces con PBS-Tween durante 15 min y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario especie específico acoplado a peroxidasa durante 1 h a TA. Al finalizar esta incubación, la membrana se lavó 4 veces con PBS-Tween. Finalmente, los inmunoblots se revelan con el sustrato para peroxidasa Western-lightning, según las instrucciones del proveedor (Perkin-Elmer Life Sciences), exponiendo la membrana a película hipersensible X-Omat (Kodak).

La intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa ImagePro Plus versión 5.0. Para evaluar los datos estadísticamente se utilizó una prueba de ANOVA y una prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando el programa GraphPad Prism version 4.0 para Windows.

Antes de hacer las inmunodetecciones, las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE 11% y se tiñeron con azul de coomasie para ajustar y normalizar la cantidad de proteína total que había en cada muestra; también revelamos las membranas utilizando un anticuerpo anti-vimentina como se muestra en la Figura 2 del artículo, para normalizar y ajustar la cantidad de proteína que cargamos de cada muestra y así hacer el análisis densitométrico.

Inmunofluorescencia

Las células MA104 fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 48 pozos, transfectadas e infectadas como se mencionó anteriormente. A las 8 hpi, las células se lavaron con PBS y se fijaron con una solución 2% de paraformaldehído (Sigma) en PBS durante 20 min. Las células se lavaron 4 veces con PBS-NH₄Cl 50 mM por 5 min y fueron permeabilizadas con 0.5% triton X-100 en PBS, 50 mM NH₄Cl, 1% BSA por 15 min a TA y en seguida se lavaron con PBS-50 mM NH₄Cl 4 veces por 5 min. Las células fijadas y permeabilizadas se incubaron con el o los anticuerpos primarios diluidos en PBS, 1% BSA, 50 mM NH₄Cl por 1 h a TA y, posteriormente, las células se lavaron 4X 5 min con PBS-50 mM NH₄Cl. Finalmente, se incubaron con el o los anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a los fluoróforos diluidos en PBS y, los núcleos se tiñieron con DAPI por 5 min y, al final de la incubación se lavaron 4 veces. Los cubreobjetos con las células hacia abajo se montaron sobre un portaobjetos con 3 µl de glicerol al 70% en PBS, sellando los bordes con barniz para uñas. Finalmente las preparaciones fueron analizadas y las imágenes capturadas en un microscopio de epifluorescencia Axioskop2 met plus (Zeiss).

Marcaje metabólico

Células en placas de 48 pozos y/o en F25 fueron transfectadas con los siRNAs e infectadas con RRV como se ha descrito anteriormente. A las 5 hpi, las células fueron incubadas con MEM sin metionina por 1 h, y las proteínas fueron marcadas con 50 µCi de Easy Tag express-³⁵S (407 MBq) (Perkin Elmer, NEN)/ml. Las células en placas de 48 pozos se incubaron por 1 h y las células en los F25 se incubaron por 6 horas.

Las células en placas de 48 pozos se lisaron con amortiguador de lisis no desnaturalizante (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 µg de aprotinina por ml, 2 µg de leupeptina por ml, and 20 µg of phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) por ml). Antes de usarlos, los lisados fueron clarificados de residuos celulares por centrifugación a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) por 2 min en una microcentrifuga. Las células en F25 fueron congeladas.

Pulso y caza

Células en placas de 48 pozos, transfectadas con los siRNAs e infectadas con RRV como se ha descrito anteriormente, fueron incubadas a las 6 horas post-infección (hpi) con MEM sin metionina por 1 h, y las proteínas virales fueron marcadas por 5 min con 200 µCi de metionina L-[³⁵S] 5 mCi (185MBq) (Perkin Elmer, NEN)/ml. Las células se lavaron e incubaron con medio que contenía un exceso de metionina (10 mM) y 1 mM de cicloheximida (Sigma) para bloquear la traducción de las proteínas. Después del periodo de caza, las células fueron incubadas con PBS frío

que contenía 40 mM de N-etilmaleimida (NEM) (Sigma) por 2 min para prevenir rearrreglos de los puentes disulfuro. Las células fueron lisadas con amortiguador de lisis no desnaturante (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 µg de aprotinina por ml, 2 µg de leupeptina por ml, y 20 µg de phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) por ml). Los lisados fueron clarificados de residuos celulares por centrifugación a 13,000 rpm por 2 min en una microcentrifuga antes de usarlos.

Gradientes de cloruro de cesio

Células MA104 crecidas en F25 y transfectadas con los siRNAs se infectaron con RRV y se marcaron radiactivamente como se describió previamente. A las 12 hpi, las células se lisaron congelando y descongelando 2 veces, y los lisados se centrifugaron a 30,000 rpm durante 1 h, la pastilla se resuspendió en 750 µl del amortiguador TNC (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, CaCl 10 mM) y se extrajo con 1 vol igual de freón (triclorotrifluoroetano). Se centrifugó a 6,000 rpm durante 5 min, y se recuperó la fase acuosa, en donde se encontró el virus. Esta extracción se repitió 3 veces. Para separar por densidad a las partículas virales DLPs y TLPs, al virus extraído se le adicionaron 2.2 g de CsCl y se llevó a 5 ml con TNC, posteriormente, se centrifugó a 36,000 rpm durante 18 h en el SW50.1. Las bandas opalescentes se visualizaron bajo la luz de una lámpara y se tomaron fotografías con una cámara digital. Estas bandas fueron colectadas por punción. La composición de proteínas en cada banda se resolvió mediante electroforesis.

La marca radiactiva incorporada en cada banda se determinó midiendo las cuentas precipitables con ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich), para lo cual se utilizó un contador de centelleo.

Las muestras se desalaron mediante centrifugación con columnas de sephadex G-25 y el virus fue activado con tripsina y titulado como se mencionó anteriormente.

Ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA).

Los lisados de células infectadas marcados radiactivamente (20µl) ó (40µl en el caso de partículas virales purificadas) fueron incubados con las proteínas G o A, acopladas a sefarosa (Zymed) durante 1 h a TA, para eliminar lo que pudiera estar pegando inespecíficamente a la sefarosa. Posteriormente, se centrifugó a 2,000 rpm por 3 min y el sobrenante SN se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (2 µl de los anticuerpos monoclonales o 5 µl de los anticuerpos policlonales) más 80 µl de amortiguador RIPA (1% Triton X-100, deoxicolato de sodio 1%, Tris-HCl 50 mM [pH 7.5], NaCl 150 mM, SDS 0.1%, PMSF 20 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml) durante 1 h a TA en agitación. Estas muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min para remover agregados que se pudiesen haber formado. En un tubo limpio se incubó el SN con 25 µl de sefarosa-proteína A o G por 1 h a TA en agitación. La resina se lavó 3 veces con 500 µl de RIPA,

centrifugando a 6,000 rpm por 2 min cada vez. Los complejos inmunoprecipitados fueron resuspendidos en amortiguador de muestra, se hirvieron por 5 min y se sometieron a SDS-PAGE 10%.

Ensayos de unión

Monocapas de células crecidas en placas de 48, se lavaron 2 veces con MEM sin suero y se incubaron con el virus previamente purificado y desalado diluido en MEM 1% de BSA en un volumen final de 200 μ l durante 1 h a 4 °C en agitación suave. Las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS frío-0.5% BSA y se lisaron con 50 μ l de amortiguador de lisis (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 μ M, Triton 0.1% X-100). El virus presente en los lisados fue cuantificado mediante un ensayo de ELISA (Zarate et al. 2000).

RT-PCR en tiempo real

Las células MA104 fueron crecidas en placas de 48 pozos y transfectadas con los siRNAs correspondientes. A las 72 h post-transfección, las células fueron lisadas con TRIzol (Invitrogen) y el RNA total fue purificado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El RNA total fue tratado con DNAsa (Ambion), para remover la posible contaminación con DNA, siguiendo las instrucciones del proveedor. El nivel de los mensajeros de las chaperonas moleculares y los genes de estrés fue determinado mediante RT-PCR en tiempo real en un paso, los oligos diseñados para las amplificaciones se muestran en la Tabla 2. Cada tubo de reacción contenía 120 ng de RNA total, 12.5 μ l de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0.125 μ l de Transcriptasa reversa 50u/ μ l (Applied Biosystems), 0.25 μ l de Inhibidor de RNAsa 20u/ μ l (Applied Biosystems), y 2 μ l de oligos (2.5 pmol/ μ l) en un volumen total de 25 μ l. Las amplificaciones se obtuvieron utilizando el siguiente protocolo: Transcripción reversa: 48°C por 30 min; inactivación de la transcriptasa reversa 95°C por 10 min; PCR: 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min; fase de disociación de 60°C a 95°C por 30 min; en un sistema de detección ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Los resultados fueron normalizados con los niveles de RNA mensajero de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa GAPDH en cada muestra. Las veces de aumento o disminución fueron calculadas utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001). La información se expresa en veces de aumento con respecto al control.

TABLA 2. Secuencia nucleotídica de los oligos usados para RT-PCR en tiempo real.

Gene	Forward primer	Reverse primer
Grp94	TCC GCC TTC CTT GTA GCA GAT A	TTG TCG TTC CCC GTC CTA GA
Grp78	ACC GCT GAG GCT TAT TTG GG	TGC CGT AGG CTC GTT GAT G
Calnexin	TCC TTG AAG CAA ATG TGT GG	ACT GTC AAC GGA GGG TGA AG
PDI	CCG AAG ATT TTT GGA GGT GA	TGC TCA GTT TGC CGT CAT AG

calreticulin	CGA GGA CTG GGA TGA AGA GA	AAT CTG GGT TGT CGA TCT GC
ERp57	CTG TAA GAA CCT GGA GCC CAA GT	TCA TTG GCT GTG GCA TCC AT
gapdh	ACC TGA CCT GCC GTC TAG AAA	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA T
EDEM	CTC CTC TAC CAG GCA ACC AA	GGC GTA CCC ACA CTT GAC TT
CHOP	GCT CTG ATT GAC CGA ATG GT	TCT GGG AAA GGT GGGTAG TG
hsc70	AGA TTT GCT GCT CTT GGA TGT CA	CTG CTT GGT AGG AAT GGT GGT AT
hsp70	CCA CCA AGC AGA CGC AGA T	GAT GCC GCT CAG CTC GAA
P58	CAT GAA AAC AGA GCC AAG CA	TCA ACA GGC TTC TCG TCC TT
GADD34	GAG GGC AGG GAA GTC AAT TT	TCC TCC CCT GGG TTC TTA TC

Tratamientos con EGTA y diferentes temperaturas

Las TLPs, purificadas en los gradientes de CsCl y desaladas previamente, fueron incubadas en una solución de PBS que contenía diferentes concentraciones de EGTA (0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM y 0.5 mM) por 20 min a 37°C. Al final de esta incubación, los virus fueron diluidos 10 veces en MEM sin suero.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la infectividad del virus, las TLPs fueron incubadas a 45°C durante 5 min, 10 min o 15 min, a 50°C por 5 min y a 37°C por 15 min.

Después de los tratamientos con EGTA y diferentes temperaturas, los virus fueron titulados en monocapas de células MA104, sembradas en pozos de 96 pozos, como se describe anteriormente.

Digestión con las endoglicosidasas Endo H y Endo D

Las proteínas VP7 y NSP4 inmunoprecipitadas fueron liberadas de la proteína A sefarosa y se desnaturalizaron al hervirlas por 3 min en 30 µl de amortiguador de digestión de endo-D (Na₂HPO₄ 50 mM pH 6.5 (citrato de sodio), EDTA 5 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 2%, e inhibidores de proteasas). Después se dejó enfriar a TA y se agregaron 20 µl de amortiguador de digestión más 2.5 mU de endoglicosidasa D (Calbiochem), y se incubó por 4 h a 37°C.

Las proteínas VP7 y NSP4 inmunoprecipitadas fueron incubadas con 50 µl de acetato de sodio 50 mM pH 5.5, conteniendo 0.01% de SDS y 5 mU de endoglicosidasa H (Roche) por 4 h a 37°C.

Las reacciones en ambos casos se detuvieron calentando 3 min en amortiguador de muestra y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE 12.5 %.

Ensayo de hemaglutinación

Se utilizaron eritrocitos tipo O resuspendiéndose en Alsever (ácido cítrico 0.4 g, citrato de sodio 1.126 g y glucosa 1.1 g en 100 ml de agua destilada). Los eritrocitos se lavaron con PBS 3 veces, centrifugando a 1000 rpm por 10 min y finalmente se resuspendieron en PBS-BSA 0.4%. Posteriormente, en placas de 96 pozos se hicieron diluciones secuenciales de las TLPs en PBS-BSA

0.4%, colocando 25µl en cada pozo. Se agregó la suspensión de eritrocitos (25µl) en cada pozo y se agitó.

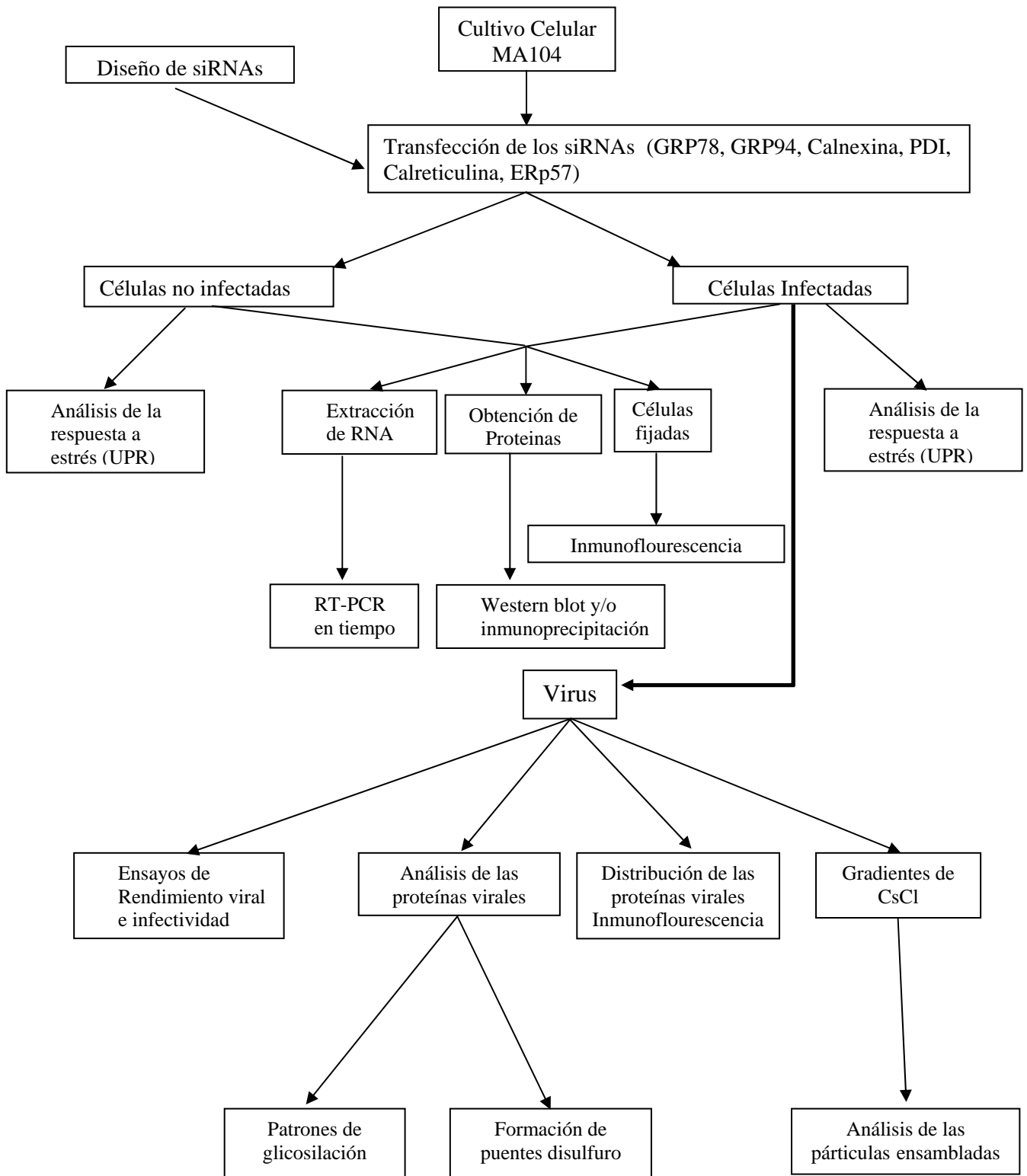
Tratamiento de las células con tapsigargina, castanospermina y dithiotreitol.

Para inhibir la ATPasa de calcio del RE, se adicionaron 2µg/ml de tapsigargina (TSG) al medio desde la primera hora de infección y se mantuvo por 6 h hasta la lisis celular. Para obtener proteínas marcadas sintetizadas bajo condiciones reducidas, se agregó 2 mM dithiotreitol (DTT) 20 min antes del pulso con metionina S³⁵ y se mantuvo esta concentración durante el periodo de caza. Para inhibir a las glucosidasas I y II, se añadió 1mM de castanospermina (CST) al medio desde las 4 hpi y se mantuvo hasta el momento de lisar las células.

Análisis del procesamiento de Xbp1 por RT-PCR

Las células MA104 en las que los mensajeros de las chaperonas moleculares fueron silenciados, se lisaron con TRIzol (Invitrogen) para obtener el RNA total. El cDNA se obtuvo al realizar una transcripción reversa en la cual se incubó 1µg de RNA total más los reactivos para hacer transcripción reversa con el kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). Para amplificar el mensajero de Xbp1 (NM_005080), el PCR se realizó usando el siguiente protocolo: 30 ciclos (94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 1 min) y un periodo de elongación de 10 min al final, usando a la enzima Vent (New England. BioLabs). Para esta amplificación se utilizaron oligos previamente reportados por Shang y Lehrman (Shang and Lehrman 2004). El fragmento de 398 pb representa el mensajero de Xbp1 procesado (XBP1s), mientras que el fragmento de 424 pb representa el mensajero de Xbp1 no procesado (XBP1u). Los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio, o en geles de poliacrilamida 10% para RNA teñidos con nitrato de plata.

Esquema de trabajo



RESULTADOS

Parte de los resultados que se muestran a continuación forman parte del artículo: JVI02751-07 incluido como anexo I.

La infección con rotavirus ocasiona un cambio en la distribución de las chaperonas moleculares

El último paso durante el proceso de ensamble de rotavirus se lleva a cabo en el RE, donde las glicoproteínas virales VP7 y NSP4 son sintetizadas y las DLPs geman para adquirir la capa externa y concluir el proceso de morfogénesis. La distribución que tienen las proteínas virales que se sintetizan en el RE se ha analizado previamente (Gonzalez et al. 2000); sin embargo, la distribución que tienen las chaperonas moleculares del RE con respecto a las glicoproteínas virales, no ha sido determinada.

En este trabajo observamos la distribución de las proteínas celulares con respecto a las virales en el RE de células infectadas, por ensayos de inmunofluorescencia (IF). Para ésto, sembramos células sobre cubreobjetos y las infectamos con RRV a una MOI de 5. A las 9 hpi las fijamos y teñimos utilizando anticuerpos para detectar: NSP5 (una proteína de viroplasma), NSP4 y VP7; las dos glicoproteínas del RE y las chaperonas de RE, Grp94, PDI, calreticulina y calnexina (Figura 1A del artículo pag. 122 [Anexo I]). Grp78 y ERp57 no fueron evaluadas debido a que no contábamos con anticuerpos que detectaran a estas proteínas mediante IF.

Como podemos observar en la Figura 1A del artículo, la distribución de todas las proteínas celulares analizadas, mostró un patrón reticular normal de RE en células no infectadas; sin embargo, las chaperonas luminales del RE, PDI, Grp94 y calreticulina, cambiaron su distribución en células infectadas, agrupándose principalmente cerca de los viroplasma y colocalizando con las glicoproteínas del virus VP7 y NSP4.

Por otro lado, también observamos que calnexina, una chaperona transmembranal, no cambió su distribución con la infección, y tampoco se observó una colocalización con las proteínas del virus, a pesar de que se ha reportado que calnexina interacciona con NSP4 (Mirazimi and Svensson 2000).

Aunado a ésto y para determinar si el cambio en la distribución de las chaperonas luminales del RE correlacionaba con el tiempo de la infección, infectamos a las células y las fijamos a diferentes horas post-infección (hpi), 4 h, 6 h y 8 h, y detectamos a las proteínas celulares y virales por IF (Figura 1B del artículo pag. 122 [Anexo I]).

A las 4 hpi la PDI presentó una distribución normal de RE parecida a la que vemos en células no infectadas (Figura 1A del artículo pag. 122 [Anexo I]), sin embargo, a las 6 hpi esta proteína celular se acumula en algunas células infectadas cerca de los viroplasma y de las proteínas

VP7 y NSP4, este efecto fue más evidente a las 8 hpi. Los resultados para Grp94 y calreticulina no se muestran pero ocurrió lo mismo que en el caso de PDI.

Esta es una observación importante, ya que aunque se había visto por inmunoprecipitación que estas chaperonas pueden interactuar con algunas proteínas estructurales del virus, no se había observado que la infección causara un arreglo en la distribución de estas chaperonas en el RE y que este evento fuera dependiente del tiempo de infección.

Silenciamiento de las chaperonas moleculares del RE mediante RNAi

Una vez que observamos que había una colocalización y una acumulación de las chaperonas moleculares hacia donde se encontraban las proteínas virales que se sintetizan en el RE, decidimos estudiar el papel de algunas de estas chaperonas moleculares, miembros de los dos sistemas de plegamiento propuestos en el RE, sobre la morfogénesis de rotavirus. Para esto, diseñamos secuencias de siRNAs (small interference RNA) contra el mensajero de cada una de las chaperonas, de acuerdo con las reglas recomendadas por Dharmacon Research Inc. (Lafayette, Co., EUA) (Elbashir et al. 2001). Estos siRNAs fueron titulados para conocer la concentración mínima necesaria para disminuir el nivel de mensajero y proteína respectivos, sin que resultaran tóxicos para las células. Como control negativo en todos los experimentos, utilizamos un siRNA irrelevante dirigido contra GFP (Proteína verde fluorescente) (Dharmacon).

Con la finalidad de estandarizar la técnica para inhibir estos genes celulares, hicimos experimentos partiendo de diferentes estados de confluencia de las células (30, 50, 70 y 100%), transfectamos una y/o dos veces con dos lípidos diferentes (Lipofectamina y Oligofectamina), analizamos el tiempo que era necesario incubar la mezcla de interferente y lípido con las células e hicimos ensayos de viabilidad e inmunodetección en membrana como métodos de evaluación en cada caso (datos no mostrados). De estos resultados, obtuvimos el protocolo que se menciona en la sección de materiales y métodos.

Inicialmente evaluamos si al silenciar alguna de las chaperonas había cambios en los niveles de RNA mensajero y proteína de las otras chaperonas. Para esto medimos los niveles de cada una de ellas al silenciarlas en células MA104, utilizando inmunodetección en membrana para medir el nivel de proteína (Figura 2A del artículo pag. 123 [Anexo I]) y RT-PCR en tiempo real para detectar el nivel de RNA mensajero (Figura 2B del artículo pag. 123 [Anexo I]).

En la Figura 2A del artículo se observa que todos los interferentes disminuyeron la cantidad de proteína contra la cual fueron diseñados, aunque a diferentes niveles. Además, al interferir el gen de Grp78 aumentaron significativamente los niveles de las proteínas Grp94, PDI, calreticulina y ERp57 (Grp94 5.2 veces, PDI 2.2 veces, calreticulina 3.2 veces y ERp57 2.5 veces). De la misma manera, al utilizar el interferente contra calreticulina, el nivel de expresión de Grp94 y PDI aumentó

significativamente (Grp94 3.9 veces y PDI 2.5 veces). Al silenciar Grp94, PDI, calnexina y ERp57, no hubo cambio en el nivel de mensajero y proteína de las chaperonas evaluadas.

Como se observa en la Figura 2B del artículo, el nivel de aumento o disminución del RNA mensajero cuando las chaperonas moleculares fueron silenciadas, es muy similar a los datos obtenidos de los niveles de proteínas. Excepto que al silenciar calreticulina, encontramos que la cantidad de RNA mensajero de ERp57 incrementó, pero no el nivel de proteína. También con este siRNA encontramos que a pesar de que el nivel de proteína de PDI aumentó, no aumentó el nivel de su RNA mensajero.

Estos resultados sugieren que al silenciar el gen de Grp78 hay un aumento de las proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas reguladas por glucosa (grp's), entre las que se encuentran: Grp94, Grp78, calreticulina, PDI y ERp57. Por otro lado, la ausencia de calreticulina también estaría provocando la inducción de algunas de estas chaperonas de la familia de las grp's.

Una posible explicación a los datos anteriores es que estemos viendo un efecto en la inducción de la UPR. Grp78 es la proteína reguladora negativa de esta respuesta y al estar unida a los tres efectores de este evento (Ire1, ATF6 y PERK), previene el aumento de las chaperonas moleculares, entre las que se encuentran calreticulina, Grp94, PDI y ERp57; por lo que al disminuir el nivel de Grp78 en la célula, la Grp78 remanente se una a las proteínas que estén mal plegadas en RE y deje libres a los factores inductores de UPR y por lo tanto la síntesis de proteína y mensajero de las chaperonas moleculares aumenten.

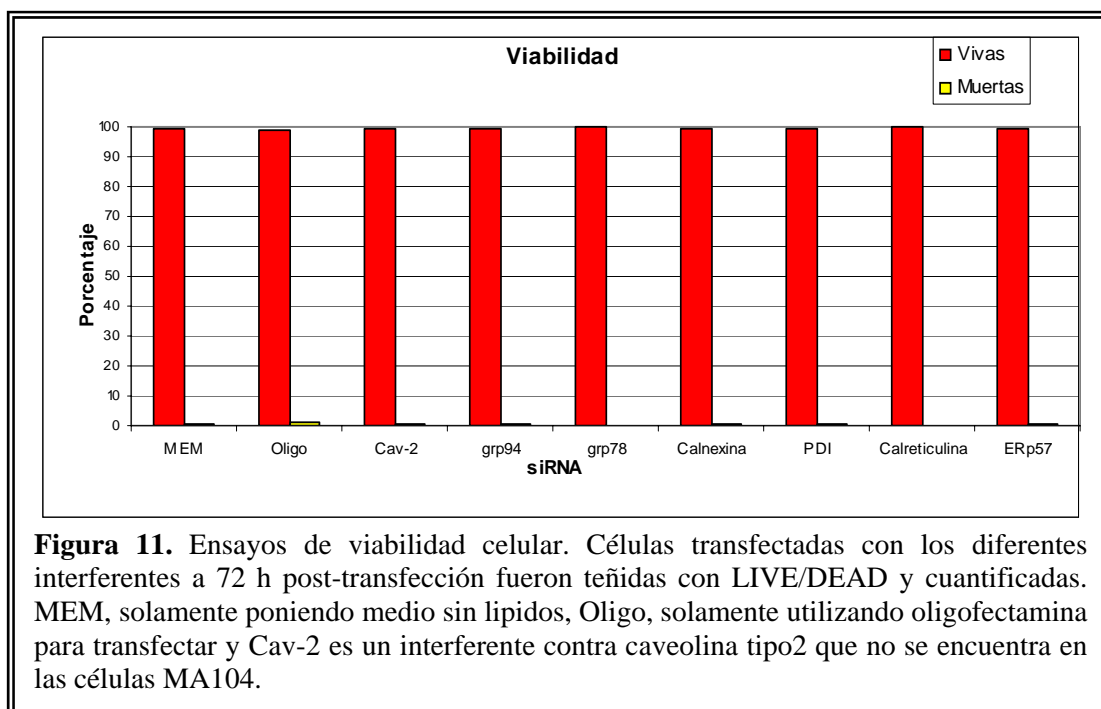
Para confirmar esta hipótesis probamos si en ausencia de Grp78 y calreticulina se desencadenaba una UPR (ver resultados adicionales pag. 138 [Anexo II]); encontramos que en ausencia de Grp78 y calreticulina se da una activación de la UPR, en la cual solo la vía de ATF6 se induce.

Previamente se describió que las chaperonas moleculares son importantes para que las células no desencadenen procesos de apoptosis, por lo que evaluamos la viabilidad de las células cuando silenciamos a las chaperonas moleculares, para esto utilizamos el reactivo LIVE/DEAD de Molecular Probes, que tiñe células vivas en verde y muertas en rojo, lo que permite visualizarlas *in situ* mediante microscopia de fluorescencia y cuantificarlas.

En la Figura 11 se observa que el 99% de las células estaban vivas y esto se observó, tanto en células en las que las chaperonas fueron silenciadas, como en los controles. Lo que sugiere que a pesar de los bajos niveles de estas chaperonas moleculares presentes en estas células, no se afecta la viabilidad.

Para continuar con la evaluación del silenciamiento de las chaperonas en células MA104, evaluamos mediante IF si la distribución que tenían las chaperonas estudiadas en la célula se

modificaba al silenciar a las otras chaperonas (Figura 12). Como podemos observar en las IF, algunas de estas proteínas cambiaron su distribución subcelular al interferir a otras chaperonas.



Al disminuir la expresión de Grp78 encontramos que el patrón de distribución de las otras chaperonas evaluadas cambió y dió la impresión de haber una fragmentación del RE en estas condiciones. Por otro lado, notamos que al interferir Grp94, el patrón que presentaron las proteínas Grp78, calnexina y PDI no cambió. Al interferir PDI observamos que cambia el patrón de distribución tanto de Grp94 como de calnexina, viéndose la señal concentrada alrededor del núcleo.

Cuando interferimos el gen de calnexina, la distribución de las proteínas Grp94 y PDI, se vió ligeramente afectada, ya que presentan una señal que se concentra principalmente alrededor de núcleo, perdiendo la señal polarizada en el citoplasma que se observa en el control.

En estos experimentos de IF observamos que a pesar de disminuir la cantidad de proteína al silenciar a cada una de las chaperonas, quedó una señal remanente en las células, por lo que suponemos que los siRNAs interfirieron sólo parcialmente la expresión de dichas proteínas.

Los resultados anteriores sugieren que no solamente hay un cambio en el nivel de expresión de estas proteínas en la ausencia de otras, sino que también su distribución subcelular es afectada, principalmente por la ausencia de Grp78 (ver resultados adicionales pag. 140 [Anexo II]).

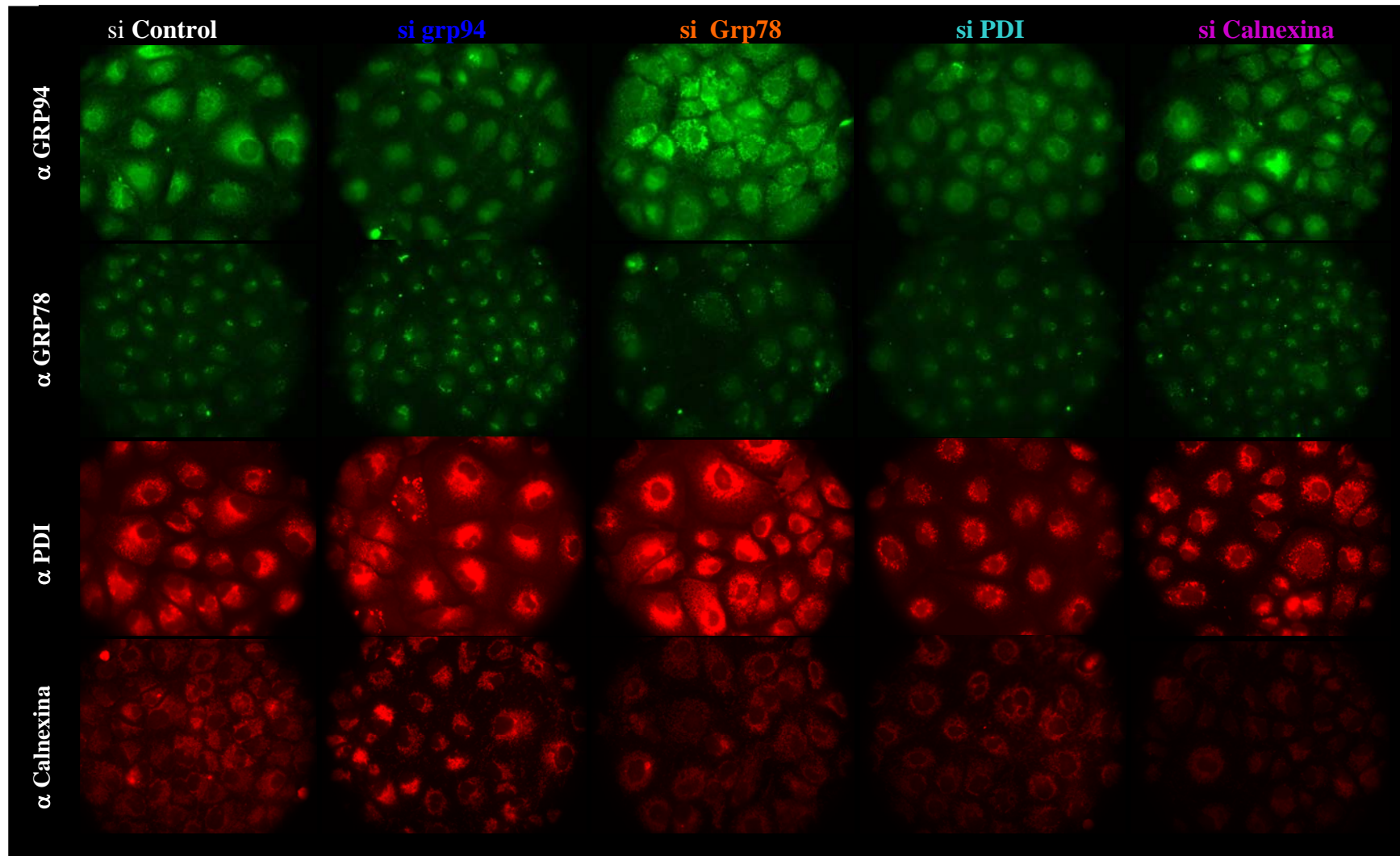


Figura 12. Inmunofluorescencias. Arriba: GRP94 reconocida con un anticuerpo monoclonal de rata y como secundario un anti rata acoplado a alexa 488. Segundo: α -GRP78 monoclonal de cabra y como anticuerpo secundario un anti cabra acoplado a alexa 488. Tercer carril: α -PDI monoclonal de ratón y como secundario un anti ratón acoplado a alexa 568. Abajo, α -Calnexina monoclonal de ratón y como secundario un anti ratón acoplado a alexa 568. En todos los casos el control son las células interferidas con un siRNA contra GFP (no presente en células MA104) y están interferidas con los siRNA como se indica en la parte superior. Se muestra una imagen representativa de al menos 6 experimentos diferentes.

La producción de progenie viral infecciosa disminuye en ausencia de algunas chaperonas moleculares

Una vez estandarizadas las condiciones de interferencia, se analizó el efecto de la ausencia de cada una de las chaperonas moleculares en la producción de progenie viral infecciosa. Para esto, las células fueron transfectadas con los siRNAs y 72 horas post-transfección las células fueron infectadas con RRV a una MOI de 3 durante 14 horas, transcurrido este tiempo las células fueron congeladas y descongeladas 2 veces, y determinamos el título viral en estos lisados mediante ensayos de inmunoperoxidasa (Figura 3 del artículo pag. 124 [Anexo I]).

Encontramos que al interferir la expresión de Grp78, calnexina y calreticulina, observamos una disminución de aproximadamente 55% en la producción de progenie viral infecciosa al compararla con células transfectadas con un interferente irrelevante. Así mismo, cuando interferimos el gen de PDI, la progenie viral infecciosa disminuyó aproximadamente 30% al compararla con el control. Por otro lado, al disminuir el nivel de expresión de Grp94 y ERp57 observamos que el rendimiento de la progenie viral no cambió con respecto al control. Estos resultados sugieren que las chaperonas Grp78, PDI, calnexina y calreticulina son importantes para la producción de progenie viral de rotavirus, y no así Grp94 y ERp57.

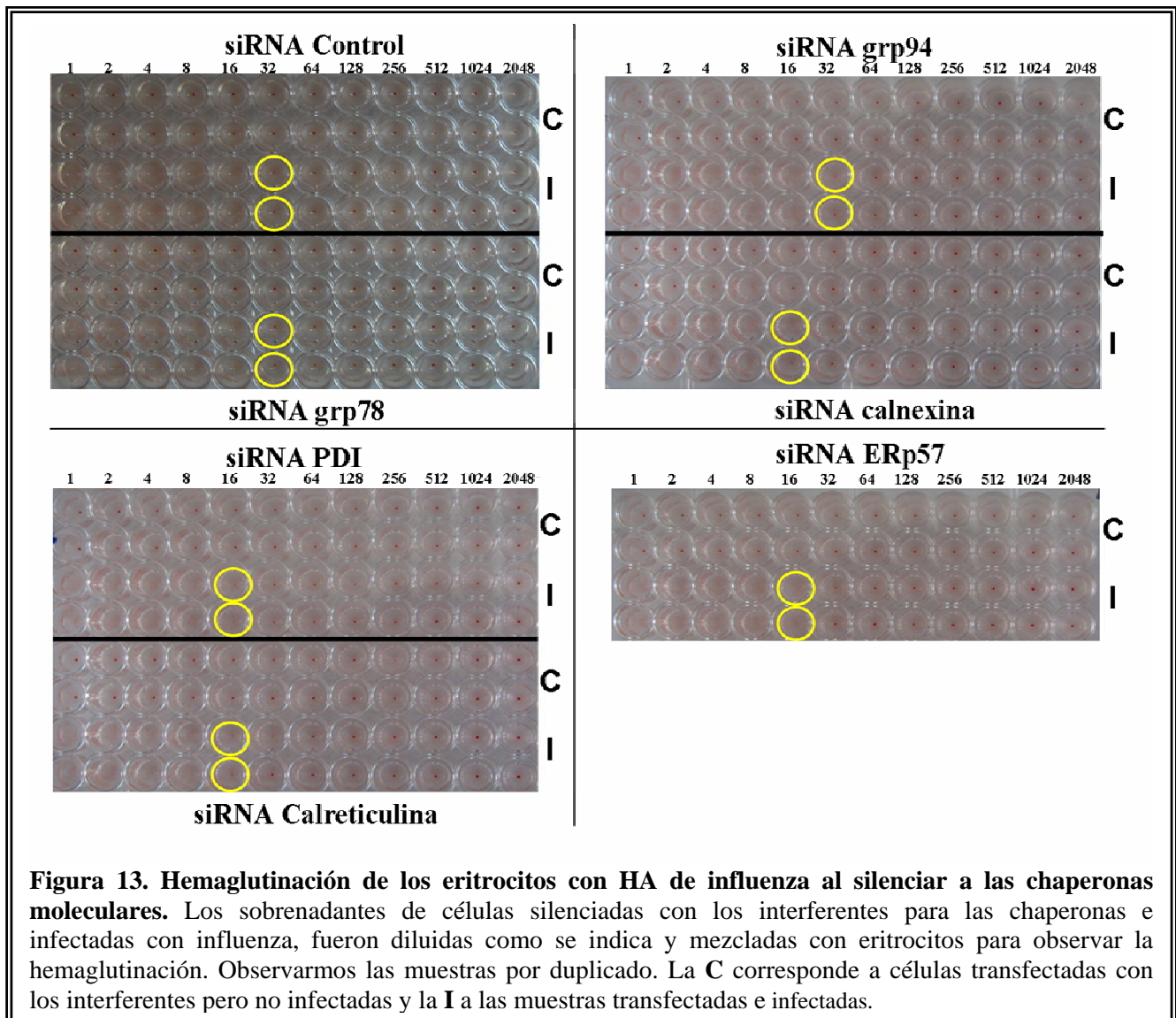
Para descartar que el efecto que observamos con el silenciamiento de las chaperonas y específicamente de Grp78 sobre el ensamble de rotavirus, fuera un efecto general sobre la célula. Probamos si el plegamiento de la hemaglutinina (HA) del virus de influenza también se afectaba al silenciar a Grp78 y a las otras chaperonas evaluadas en este estudio.

El plegamiento de la proteína HA de influenza se ha utilizado como modelo en el estudio de las chaperonas del RE. Se sabe que HA interacciona en condiciones normales con calnexina, calreticulina y ERP57 y la presencia de estas chaperonas es crucial para el plegamiento correcto de esta proteína y el ensamble de virus infecciosos (Molinari and Sitia 2005; Solda et al. 2006); sin embargo, no interacciona con Grp78 en condiciones normales, por lo que no esperabamos ver cambios en el plegamiento de HA al silenciar a Grp78.

Para evaluar el plegamiento de la proteína HA de influenza se han utilizado anticuerpos específicos que reconocen a las formas intermedias y maduras de la proteína; sin embargo, nosotros no contabamos con estos anticuerpos, por lo que decidimos evaluar el plegamiento de la proteína HA haciendo ensayos de hemaglutinación, para los cuales transfectamos a las células con los interferentes de las diferentes chaperonas y 72 horas post-transfección infectamos con el virus de influenza a una MOI de 1, 24 horas después recuperamos el SN y lo utilizamos para realizar los ensayos de hemaglutinación (ver Materiales y métodos) (Figura 13).

Encontramos que la hemaglutinación de los eritrocitos con el virus de influenza obtenido de células en las que silenciamos a Grp78 y Grp94 no disminuyó con respecto al control. Por otro lado,

observamos una disminución de la hemaglutinación de los eritrocitos, en aquellas muestras en donde silenciamos a calnexina, calreticulina, ERp57 y PDI. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de Grp78 no afecta inespecíficamente al menos el plegamiento de la proteína HA de influenza en el RE. Además, comprobamos que las chaperonas calnexina, calreticulina y ERp57 son necesarias en el plegamiento de HA de influenza, como se ha reportado previamente (Molinari et al. 2004; Solda et al. 2006).



La disminución de la progenie infecciosa de rotavirus debido a la ausencia de las chaperonas tiene dos posibles explicaciones: la primera es que estas chaperonas funcionen como co-receptores para el virus, ya que se ha reportado que algunas chaperonas pueden funcionar como moléculas co-receptoras para algunos virus en la superficie de las células (Jindadamrongwech et al. 2004; Triantafilou et al. 2002). La segunda opción, es que en ausencia de las chaperonas se modifique el plegamiento de las proteínas virales en RE y esto de lugar a un ensamble defectuoso de las TLPs durante el proceso de morfogénesis.

Para analizar la primera opción, transfectamos a las células con los siRNAs de las chaperonas y a las 72 horas post-transfección las infectamos con RRV a una MOI de 0.1. Posteriormente, dejamos transcurrir 14 horas de infección y fijamos a las células. Los focos infecciosos fueron detectados por ensayos de inmuperoxidasa (datos no mostrados). En estos experimentos no encontramos diferencias entre el número de focos infecciosos en las células en las que estaban interferidas las chaperonas y en las células control en las que utilizamos un interferente irrelevante. Estos resultados nos permiten concluir que la entrada de rotavirus no se afecta con la disminución de las chaperonas evaluadas en este estudio.

Para probar la segunda opción y analizar si la ausencia de las chaperonas tiene un efecto sobre la morfogénesis del virus hicimos los ensayos que se describen a continuación.

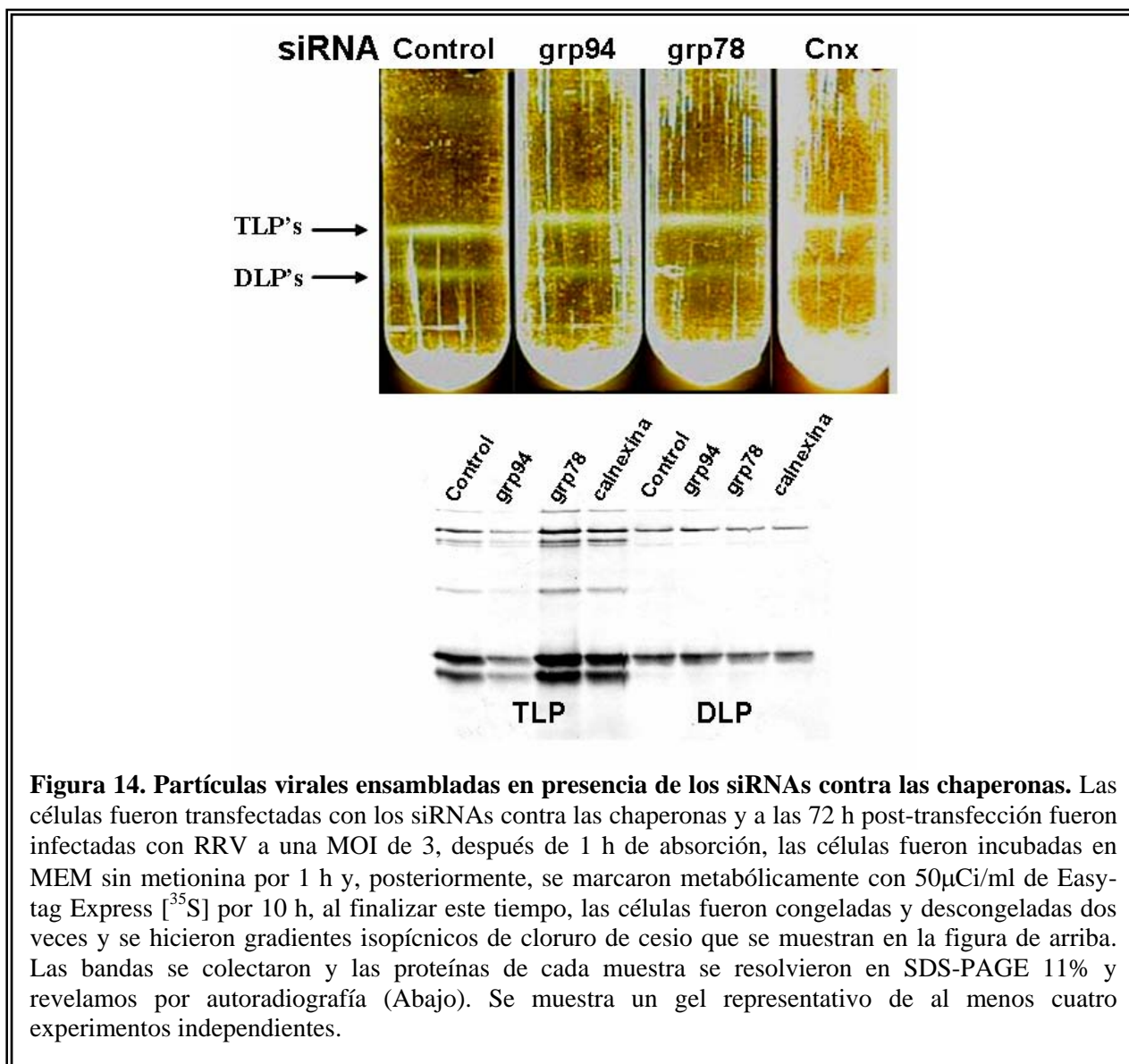
Análisis de las partículas ensambladas en ausencia de las chaperonas moleculares

Ya que habíamos detectado que la progenie viral infecciosa disminuía al silenciar Grp78 y calnexina, analizamos si esto se debía a que se ensamblaban menos partículas en estas condiciones. Para ésto, analizamos la producción de partículas virales purificándolas mediante gradientes isopínicos de CsCl y cuantificándolas como se indica en Materiales y métodos (Figura 14 y Figura 4 del artículo pag. 125 [Anexo I]).

Observamos que, en todos los casos, se forman dos bandas en los gradientes, que corresponden a las DLPs y TLPs y que éstas contienen todas las proteínas estructurales correspondientes del virus (Figura 14). Sin embargo, podemos observar en la Figura 4 del artículo pag. 125, que al silenciar a los genes de Grp78 y calnexina, la proporción de TLPs ensambladas aumenta, mientras que las DLPs disminuyen significativamente al compararlas con las de la condición control. Por otro lado, cuando interferimos con un siRNA contra Grp94, la relación entre DLPs y TLPs ensambladas, es muy similar a la que se obtiene de las células transfectadas con el siRNA control.

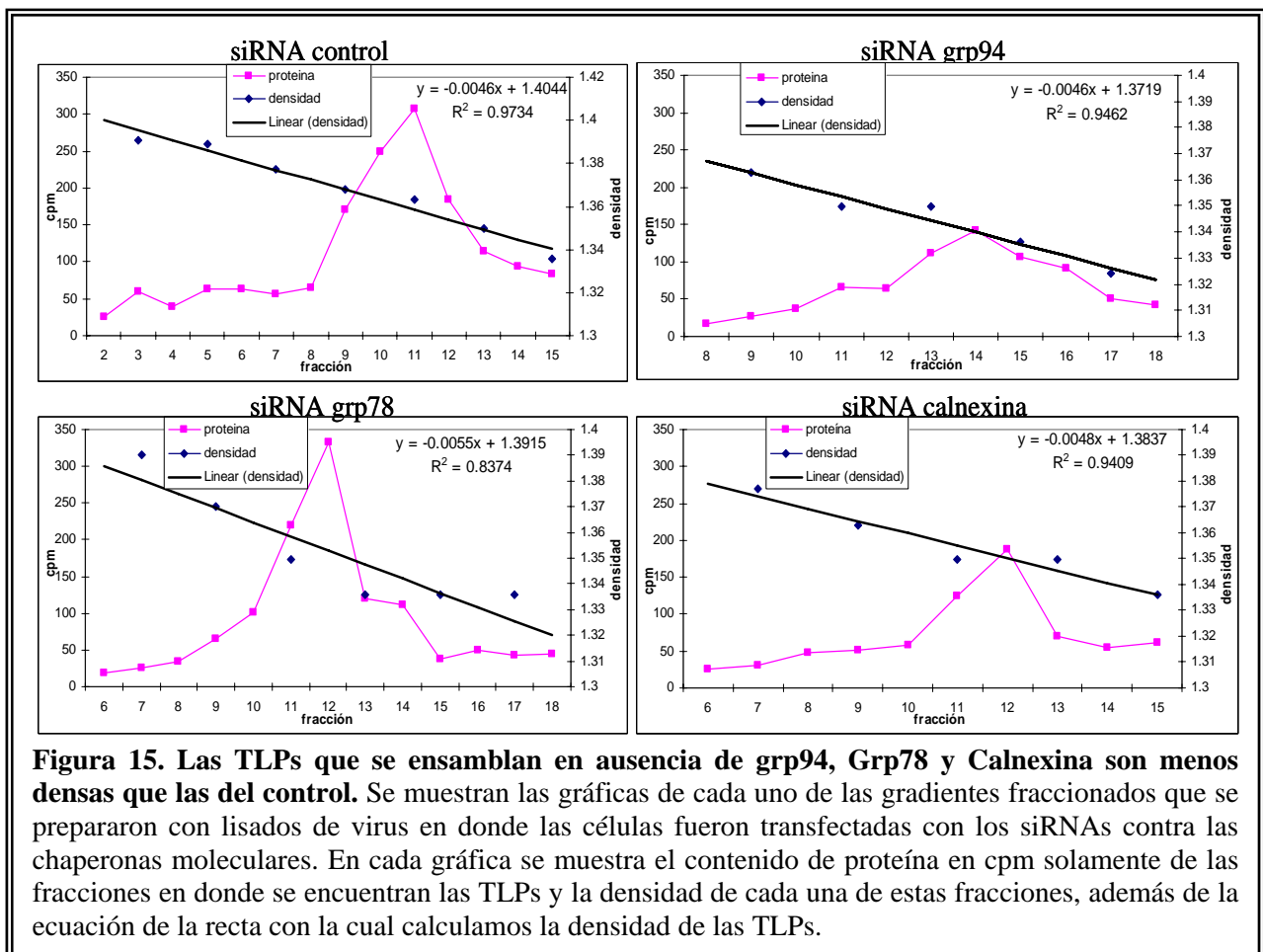
A pesar de haberse formado las bandas correspondientes a las TLPs y DLPs, se observó una pequeña diferencia en la migración entre las TLPs que se purificaron de células transfectadas con los siRNAs para las chaperonas moleculares y las obtenidas del control. Para determinar si había una diferencia en la densidad de las TLPs obtenidas, calculamos la densidad de dichas partículas en los gradientes. Para ésto, los gradientes de CsCl fueron fraccionados en volúmenes de 150 μ l y, posteriormente, se cuantificó la marca incorporada en cada una de las fracciones para determinar en qué fracciones se encontraban las DLPs y TLPs. Por otro lado, se determinó, el índice de refracción de cada fracción que posteriormente convertimos en densidad para cada una de las fracciones (Figura 15).

Los resultados fueron graficados como se muestra en la Figura 15, en el eje de las ordenadas se encuentran las diferentes fracciones colectadas, y en el eje de las abscisas se encuentran tanto la densidad (izquierda y negro) como la cantidad de proteína en cpm (derecho y rosa). La densidad de las TLPs calculada para cada gradiente se muestra en la Tabla 3.



TLPs de células transfectadas	Densidad g/cm ³
siRNA Control	1.36
siRNA grp94	1.34
siRNA Grp78	1.35
siRNA calnexina	1.35

Tabla 3. Densidad de las TLPs al silenciar a las chaperonas moleculares.



Estos resultados indican que las TLPs que se ensamblan en ausencia de Grp94, Grp78 y calnexina fueron ligeramente menos densas que las del control.

Debido a que encontramos que al silenciar a Grp78 y calnexina, la progenie viral infecciosa del virus disminuía, a pesar de, ensamblarse una mayor proporción de TLPs; decidimos medir la infectividad específica de las TLPs que se estaban formando en ausencia de esas chaperonas. Para esto, determinamos el título viral de las TLPs purificadas mediante un ensayo de inmunoperoxidasa y, por otra parte, cuantificamos la cantidad de proteína que había en las TLPs. Para obtener la infectividad específica de cada muestra calculamos el cociente de focos infecciosos entre cpm de proteína (Figura 4B del artículo pag. 125 [Anexo I]).

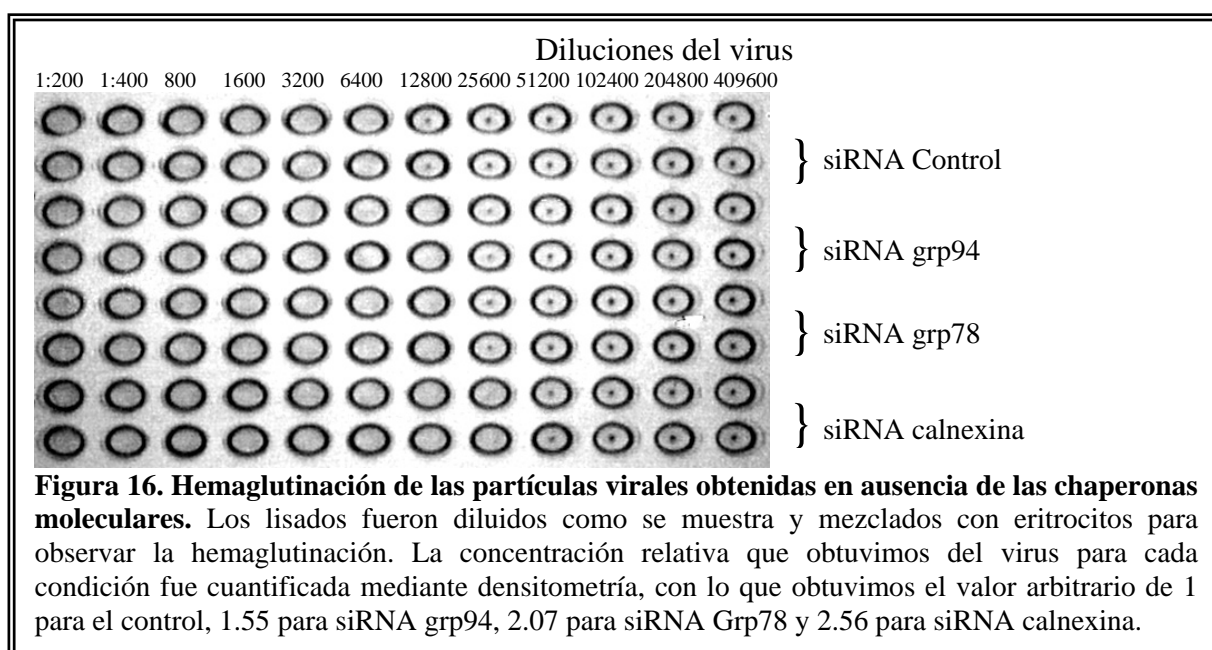
Encontramos que la infectividad específica de las TLPs ensambladas en bajos niveles de Grp78 disminuyó aproximadamente un 45% al compararlas con las TLPs del control y, la infectividad específica de las TLPs purificadas cuando se utilizó el siRNA contra calnexina disminuyó aproximadamente 55% al compararlas con las del control. Estos resultados sugieren que a pesar de haber más TLPs ensambladas, aproximadamente la mitad de estas partículas no son infecciosas.

Por otro lado, para estudiar si la disminución en la infectividad de estas partículas era debido a que no eran capaces de unirse a sus células huésped, realizamos ensayos de unión con los virus

purificados utilizando el protocolo descrito en Materiales y métodos (Figura 4C del artículo pag. 125[Anexo I]).

En estos ensayos observamos que las partículas obtenidas en ausencia de calnexina y Grp94 no disminuyeron su capacidad de unirse a las células, mientras que, las partículas obtenidas de células en las que Grp78 fue silenciada disminuyeron aproximadamente 40% su capacidad para unirse a las células (Figura 4C del artículo pag. 125). Estos resultados sugieren que las TLPs aisladas al utilizar el siRNA para silenciar a Grp78, podrían tener cambios conformacionales en la proteína viral VP4 cuya función es la unión del virus a la célula huésped, de tal manera que al no estar bien plegada las partículas producidas podrían ser menos eficientes en unirse a la célula huésped.

Una manera muy general para explorar otro aspecto de la unión de los virus a la célula huésped, es un ensayo de hemaglutinación en el que se puede determinar si los virus conservan la propiedad de interaccionar con los ácidos siálicos de los eritrocitos y deducir entonces, si hay cambios en la proteína VP4 que es la encargada de esta interacción. Como podemos observar en la Figura 16, no observamos cambios en la capacidad de hemaglutinación de las partículas obtenidas en ausencia de las chaperonas moleculares, lo que sugiere que de haber un cambio conformacional en la proteína VP4, éste es muy fino, de tal manera que con este tipo de ensayo no es detectable.



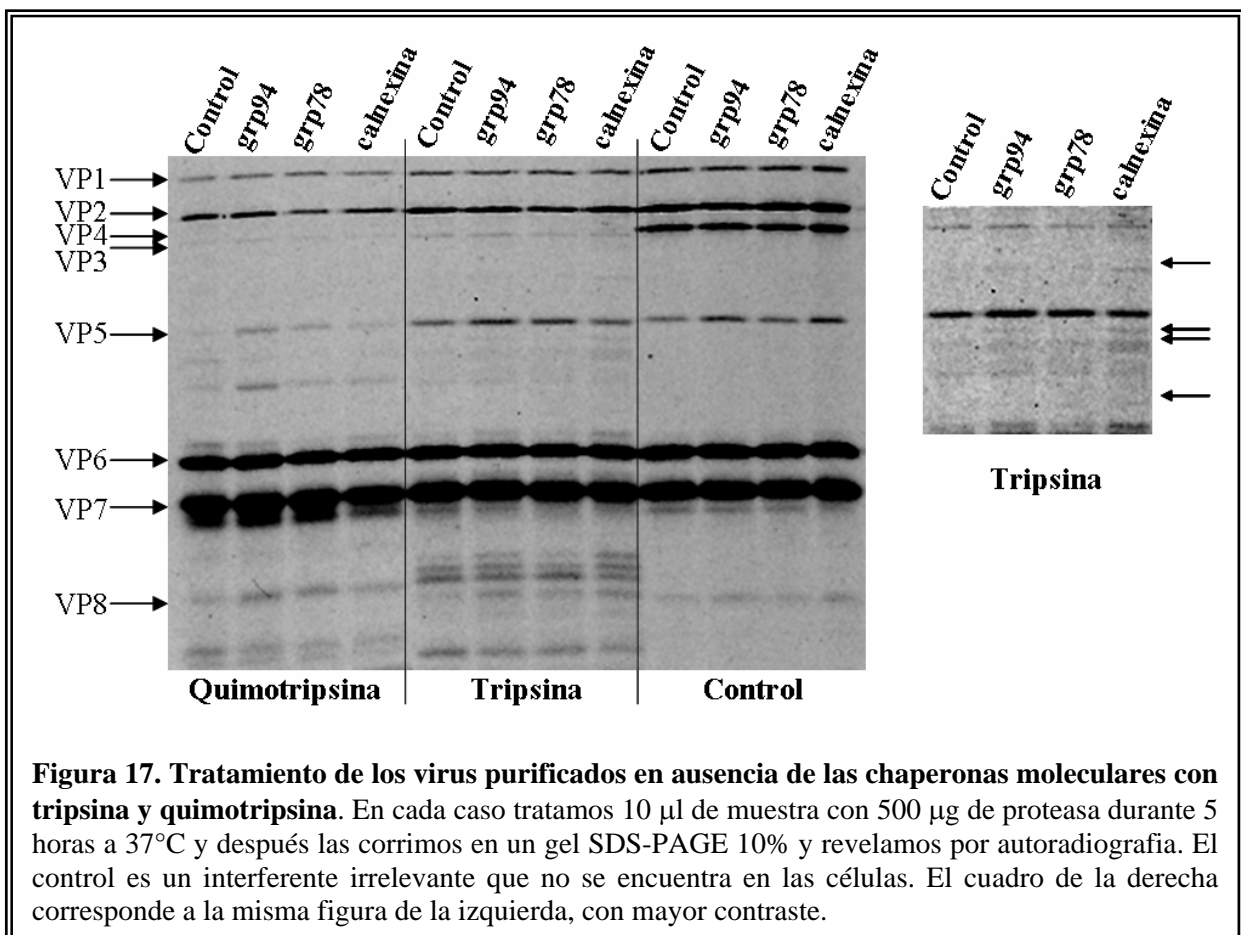
Las partículas virales ensambladas en células con bajos niveles de las chaperonas moleculares presentan cambios conformacionales

Las diferencias entre la cantidad de partículas virales ensambladas en células donde los genes de las chaperonas Grp78 y calnexina fueron silenciados y, la infectividad específica de estas

partículas, sugieren diferencias estructurales en estos virus debido a cambios en el plegamiento de sus proteínas.

Para determinar si efectivamente existían estos cambios conformacionales, las TLPs purificadas fueron sometidas a diferentes tratamientos que desestabilizan la capa externa del virus, con la consecuente disminución en la infectividad. La diferente susceptibilidad de las partículas ensambladas en células en donde se habían silenciado las chaperonas indicaría posibles cambios conformacionales.

Para evidenciar algún cambio conformacional en las partículas virales obtenidas de células en las que los genes de las chaperonas fueron silenciados, se determinó el patrón de sensibilidad de estas partículas a proteasas y se comparó con el patrón de partículas control. Para esto, las partículas purificadas se trataron con tripsina o con quimiotripsina por 5 h a 37°C y las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE 10% y reveladas con autoradiografía (Figura 17).



Ninguna de las proteínas estructurales del virus fue susceptible al corte con tripsina, a excepción de VP4. Sin embargo, se observaron bandas adicionales que aparecen en las TLPs aisladas de células en donde se silenciaron a las chaperonas Grp78 y calnexina y no en el control ó en TLPs en donde Grp94 estaba silenciada. Lo mismo sucedió al tratarlas con quimiotripsina. Las bandas que aparecen son poco evidentes y no hay ninguna proteína viral que desaparezca completamente con el tratamiento de las proteasas, por lo que llegamos a la conclusión que las

diferencias que vemos posiblemente se deban a cambios conformacionales muy sutiles en las partículas ensambladas.

Por otro lado, para evidenciar los cambios conformacionales en las partículas, hicimos tratamientos con EGTA. Para ésto incubamos a las partículas con concentraciones crecientes de EGTA (de 0.025 mM hasta 0.5 mM) durante 10 minutos a 37 °C, posteriormente, se diluyeron en MEM con 1.8 mM de calcio y fueron titulados usando un ensayo de inmunoperoxidasa para contar los focos infecciosos (Figura 5A del artículo pag. 126 [Anexo I]). El tratamiento con EGTA quela el calcio, lo provoca que se desensamble la capa externa del virus, ya que las interacciones intramoleculares entre los monómeros de VP7 son dependientes de calcio.

Encontramos que la infectividad de las TLPs purificadas de células control disminuye aproximadamente 7%, 45% y 90% cuando fueron tratadas con 0.05 mM, 0.1 mM y 0.5 mM de EGTA, respectivamente, al compararlas con las células no tratadas con EGTA. En contraste, las TLPs purificadas de células con bajos niveles de Grp78 disminuyeron 35%, 50%, 70% y 95% cuando fueron tratadas con 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM y 0.5mM de EGTA, respectivamente, al compararlas con las TLPs purificadas al silenciar las células con Grp78 pero sin tratamiento con EGTA.

Por otro lado, la infectividad de las TLPs purificadas de células con bajos niveles de calnexina disminuyeron 20%, 43%, 50% y 80% cuando fueron tratadas con 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM y 0.5mM de EGTA, respectivamente, al compararlas con las TLPs purificadas en la misma condición pero sin tratamiento con EGTA. La infectividad de las partículas virales purificadas de células con bajos niveles de Grp94 fue similar a las TLPs purificadas del control en cada una de las diferentes concentraciones de EGTA.

Estos resultados sugieren que las partículas obtenidas en ausencia de Grp78 son más susceptibles al tratamiento con EGTA que las del control; de forma similar, las partículas obtenidas en ausencia de calnexina son más susceptibles que las partículas control, pero solamente a concentraciones bajas de EGTA, ya que al aumentar la concentración de EGTA a 0.1mM la susceptibilidad es similar que las del control.

Por otro lado, las TLPs purificadas fueron sometidas a tratamientos de calor por diferentes tiempos, para desestabilizar a las proteínas de la capa externa y disminuir su capacidad de infectar a las células (Figura 5B del artículo pag. 126 [Anexo I]). Encontramos que la infectividad de las TLPs purificadas de células control o interferidas con el siRNA contra Grp94, disminuyeron su infectividad gradualmente conforme aumentó la temperatura y el tiempo.

Las TLPs ensambladas en bajos niveles de Grp78 fueron más susceptibles a estos tratamientos. Mientras que las TLPs purificadas de células en las que calnexina fue silenciada

presentaron menos susceptibilidad que las TLPs purificadas de las células control al someterlas a diferentes temperaturas.

Estos resultados sugieren que las partículas ensambladas en ausencia de Grp78 son más sensibles a la temperatura que las del control; por el contrario, las partículas obtenidas en ausencia de calnexina resultaron ser más estables que las control a una temperatura de 45°C en todos los tiempos (Figura 5B del artículo pag. 126 [Anexo I]); sin embargo, a 50°C se vuelven igual de sensibles que las partículas control (datos no mostrados).

En conjunto estos resultados sugieren que las partículas virales ensambladas en bajos niveles de las chaperonas moleculares Grp78 y calnexina presentan cambios conformacionales.

Efecto de la ausencia de las chaperonas de RE sobre la glicosilación y el plegamiento de las proteínas NSP4 y VP7

Dado que la principal función de las chaperonas moleculares del RE consiste en ayudar al plegamiento de las proteínas que se están sintetizando en este compartimento, decidimos evaluar si VP7 y NSP4 que se sintetizan en el RE estaban plegadas adecuadamente.

Para explorar si estas glicoproteínas virales mantenían un plegamiento adecuado en ausencia de las chaperonas moleculares, lo que hicimos fue analizar por un lado, si los oligosacáridos de estas glicoproteínas se estaban procesando y, por otro lado, si se estaban formando correctamente los puentes disulfuro de la glicoproteína viral VP7.

Para estudiar la glicosilación de VP7 y NSP4 decidimos hacer ensayos de pulso y caza e inmunoprecipitar a las glicoproteínas VP7 y NSP4 (Figura 18). Esto con la finalidad de observar el tiempo de procesamiento de los oligosacáridos, para ser capaces de detectar cambios en la movilidad de las glicoproteínas virales en el gel y verificar que coincidiera con los tiempos de procesamiento previamente reportados para estas proteínas (Mirazimi and Svensson 1998; Mirazimi and Svensson 2000).

Encontramos que, a medida que avanzó el tiempo de caza, los oligosacáridos fueron procesados, ya que observamos un cambio en la movilidad de ambas proteínas virales (VP7 y NSP4) (Figura 18). Encontramos que la migración de VP7 no cambia a partir de 60 min y la migración de NSP4 no cambia a partir de 90 min, por lo que estos resultados coinciden con lo ya reportado. Además, observamos una mayor cantidad de proteína inmunoprecipitada al avanzar el tiempo de caza, tanto de VP7 como de NSP4; lo cual, podría deberse a dos cosas: la primera a que posiblemente no estuviéramos eliminando por completo la marca radiactiva del medio y al avanzar el tiempo de caza obtuviéramos una mayor cantidad de proteína marcada, y la segunda a que los anticuerpos detectaran más eficientemente a las proteínas maduras que van cambiando su plegamiento conforme avanza el tiempo de síntesis.

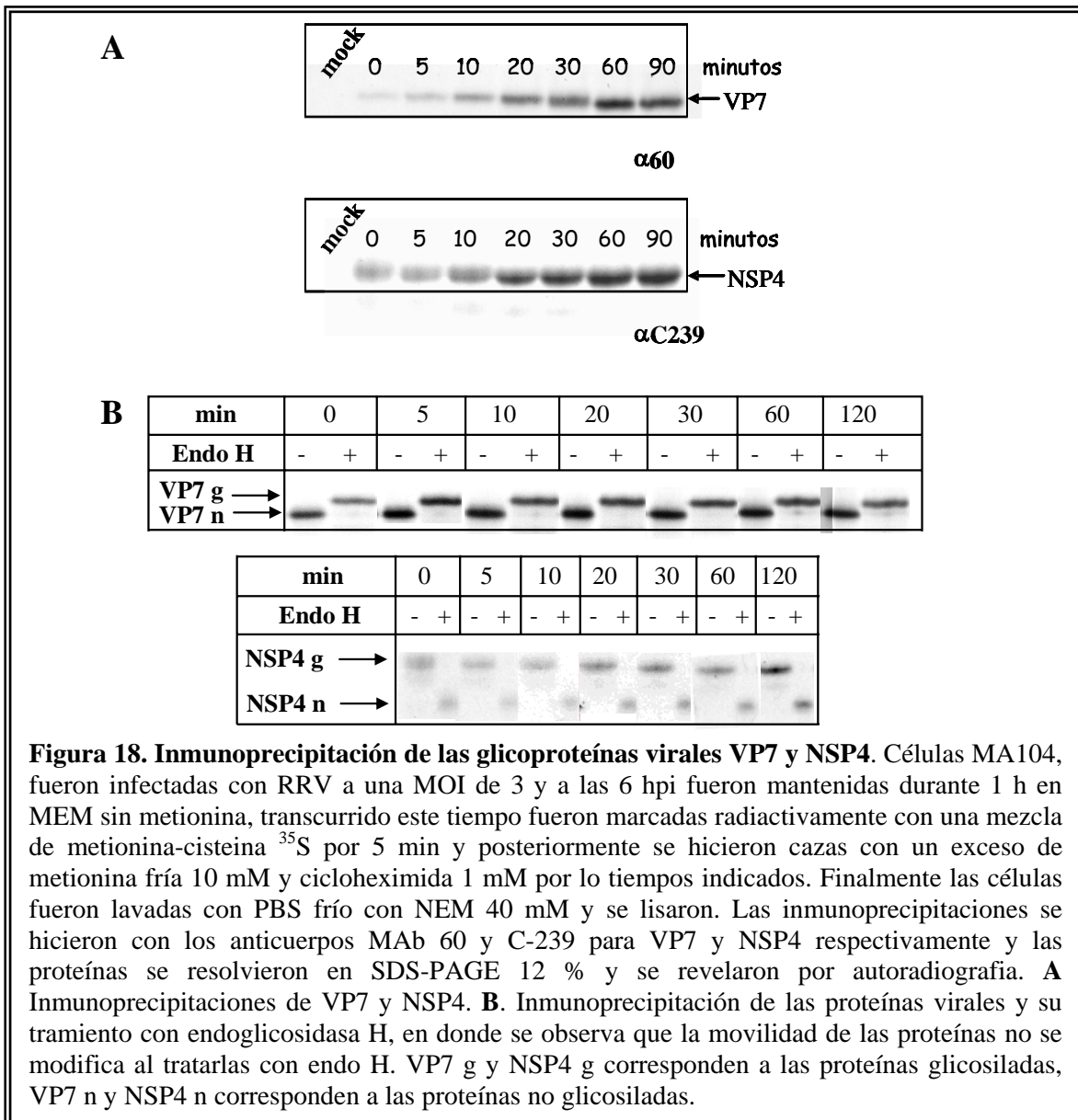
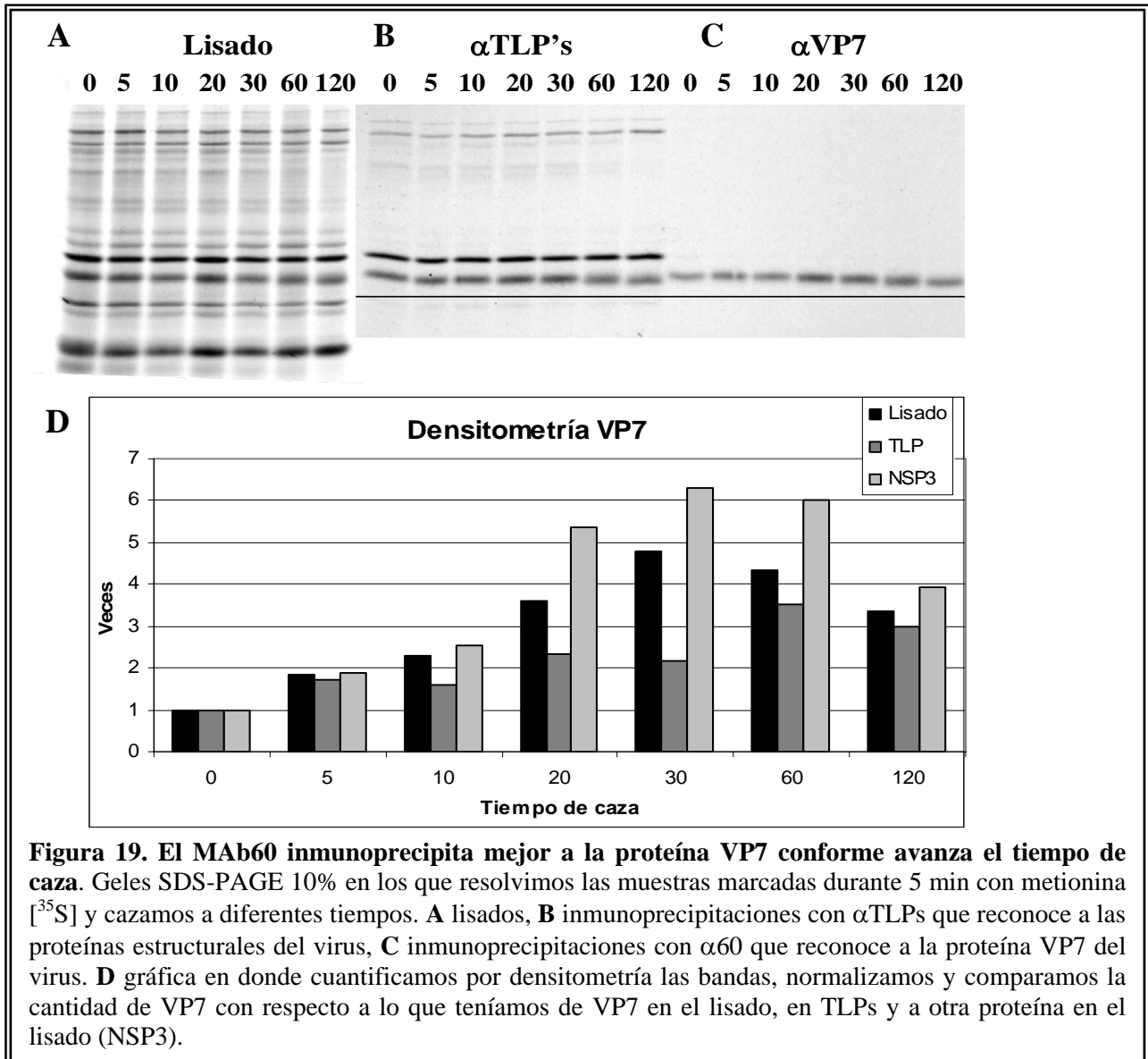


Figura 18. Inmunoprecipitación de las glicoproteínas virales VP7 y NSP4. Células MA104, fueron infectadas con RRV a una MOI de 3 y a las 6 hpi fueron mantenidas durante 1 h en MEM sin metionina, transcurrido este tiempo fueron marcadas radiactivamente con una mezcla de metionina-cisteína ^{35}S por 5 min y posteriormente se hicieron cazas con un exceso de metionina fría 10 mM y cicloheximida 1 mM por los tiempos indicados. Finalmente las células fueron lavadas con PBS frío con NEM 40 mM y se lisaron. Las inmunoprecipitaciones se hicieron con los anticuerpos MAb 60 y C-239 para VP7 y NSP4 respectivamente y las proteínas se resolvieron en SDS-PAGE 12 % y se revelaron por autoradiografía. **A** Inmunoprecipitaciones de VP7 y NSP4. **B** Inmunoprecipitación de las proteínas virales y su tratamiento con endoglicosidasa H, en donde se observa que la movilidad de las proteínas no se modifica al tratarlas con endo H. VP7 g y NSP4 g corresponden a las proteínas glicosiladas, VP7 n y NSP4 n corresponden a las proteínas no glicosiladas.

Para determinar a qué se debía el aumento de proteína conforme se incrementaba el tiempo de caza, lo que hicimos fue incubar a las células en MEM sin metionina durante 1 h y, posteriormente, incubamos con metionina pura marcada con [^{35}S] de alta radiactividad específica 150 μCi por 5 min, después lavábamos 2 veces, añadimos medio con un exceso (10mM) de metionina fría y 1mM de cicloheximida (droga que detiene la traducción de las proteínas) durante el tiempo de caza, esto con la finalidad de que no fueran sintetizadas ni marcadas más proteínas en este periodo de caza. Transcurrido ese tiempo las células se lisaron y las proteínas se inmunoprecipitaron con anticuerpos dirigidos contra VP7 o contra las proteínas estructurales del virus, las proteínas fueron separadas en geles de SDS-PAGE 12% y reveladas por autoradiografía (Figura 19).

Encontramos que la cantidad de VP7 inmunoprecipitada por el monoclonal αM60 aumenta conforme avanza el tiempo de caza, al compararlo con la cantidad de VP7 total marcada o con la VP7 de las TLPs. Estos resultados sugieren que la proteína VP7 sufre cambios conformacionales

post-traduccionales que hacen que sea mejor reconocida por el anticuerpo conforme avanza el tiempo de caza. Por otro lado, se ha reportado que este anticuerpo monoclonal reconoce a la proteína VP7 que forma sus puentes disulfuro adecuadamente (Svensson et al. 1994), por lo que podemos suponer que los puentes disulfuro no se establecen inmediatamente, sino que toman 30 minutos desde que se sintetiza la proteína, que es el tiempo al cual detectamos una mayor cantidad de proteína inmunoprecipitada.



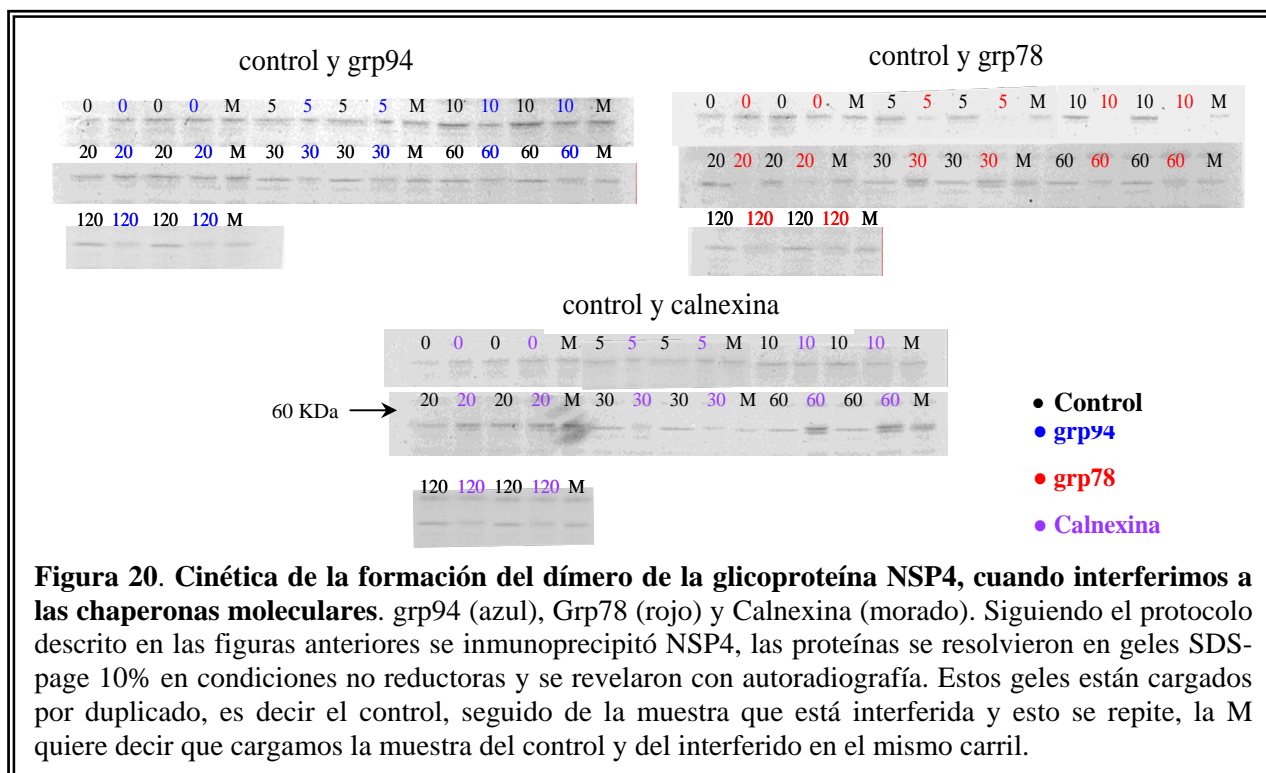
Con este método seguimos el procesamiento de las glicoproteínas virales y la formación de puentes disulfuro de VP7 en condiciones de silenciamiento de las chaperonas moleculares (Grp94, Grp78 y Calnexina). Para esto, células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs de las chaperonas y 72 h post transfección las células fueron infectadas con RRV. A las 6 hpi incubamos a las células con MEM sin metionina durante 1 hora, y dimos un pulso de 5 min con metionina [³⁵S] y cazamos a diferentes tiempos con un exceso de metionina fría y cicloheximida para, posteriormente, inmunoprecipitar a las glicoproteínas virales, finalmente las proteínas fueron separadas en geles de

SDS-PAGE 12% en condiciones reductoras y reveladas por autoradiografía (Figura 6 del artículo pag. 127 [Anexo I]).

En estos ensayos encontramos que cuando se silenció a la proteína Grp94, la movilidad de VP7 y NSP4 fue igual que el control durante todo el tiempo de caza. Por otro lado, cuando se silenció Grp78, la movilidad de VP7 disminuyó sutilmente al compararla con el control, desde los 30 min de caza y se mantuvo así hasta los 120 min de caza, así mismo, la movilidad de NSP4 también se afectó por la ausencia de esta chaperona, disminuyendo desde los 5 hasta los 30 min y, posteriormente, migra al nivel que el control. Estos resultados sugieren que la ausencia de Grp78 en estas células, retrasa el procesamiento de los oligosacáridos de las proteínas virales VP7 y NSP4, o bien que éste no llega a completarse.

Por otro lado, en la Figura 6 del artículo pag. 127 se observa que al silenciar a calnexina la movilidad de VP7 no se afectó durante el procesamiento; sin embargo, el procesamiento de NSP4 fué más rápido a los primeros tiempos de caza (0 a 10 min), formándose una banda más compacta en estos tiempos al compararla con el control. Estos resultados sugieren que la ausencia de calnexina pudiese acelerar el procesamiento de NSP4.

Por otra parte, el anticuerpo policlonal C-239 que utilizamos para inmunoprecipitar a NSP4, además de reconocer al monómero (Figura 6A del artículo pag. 127 [Anexo I]), también reconoció la forma de dímero de esta proteína en geles no reductores, por lo que al hacer las inmunoprecipitaciones evaluamos si hubo modificaciones en la migración del dímero al silenciar a las chaperonas moleculares (Figura 20).



Encontramos que durante una cinética normal de la formación del dímero de NSP4, aparecen dos bandas a los 10 min de caza y, posteriormente, aparece sólo una sola banda. Al comparar las muestras en donde interferimos Grp78 con las del control, observamos que esas dos bandas aparecen pero hasta los 30 min de caza, lo que posiblemente indique que hay un retardamiento en la formación del dímero, que se ve reflejado en el cambio de movilidad del monómero de NSP4 (Figura 6A del artículo pag. 127). Por otro lado, al silenciar calnexina y analizar la formación del dímero de NSP4, se observó la aparición de dos bandas desde los 20 hasta los 60 min de caza, siendo diferente con la cinética control, en la cual aparecen estas dos bandas a los 10 min de caza. Al silenciar Grp94, no se observaron diferencias en la cinética de formación de dímeros de NSP4.

Los resultados anteriores sugieren que al silenciar a las chaperonas Grp78 y calnexina, la cinética de formación de dímeros de NSP4 se ve alterada o retrasada, lo que coincidiría con lo que se observa para el monómero de esta proteína al silenciar a Grp78.

El cambio en la movilidad de las proteínas NSP4 y VP7 podría deberse a un cambio en el tipo de glicosilación de las proteínas en ausencia de Grp78, por lo que para descartar esta posibilidad, evaluamos la sensibilidad de las glicoproteínas virales al tratamiento con las endoglicosidasas H y D. La primera procesa únicamente a los oligosacáridos de tipo alta manosa (Man 9, Man 8 y Man5) (ver Figura 2) y, la segunda corta a los oligosacáridos con menos de cinco manosas (Man 5), por lo que, en condiciones normales las proteínas virales VP7 y NSP4 son sensibles al tratamiento con endoglicosidasa H y resistentes a la endoglicosidasa D, ya que contienen oligosacáridos de tipo alta manosa.

En este ensayo interferimos a las chaperonas y realizamos el protocolo de pulso - caza y la inmunoprecipitación como se describió anteriormente. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron tratadas con las endoglicosidasas D ó H durante 4 h a 37°C y las reacciones fueron detenidas hirviendo durante 3 min en buffer de muestra, las proteínas se separaron por SDS-PAGE 12% y se revelaron por autoradiografía (Figura 21).

Encontramos que las glicoproteínas VP7 y NSP4, indistintamente del interferente usado, fueron sensibles y resistentes al tratamiento con las endoglicosidasas H y D, respectivamente, en todos los tiempos de caza, por lo que podemos concluir que aunque haya cambios en la movilidad de estas proteínas, en bajos niveles de Grp78, éstos se deben a la velocidad en el procesamiento de sus oligosacáridos y no a que esté alterada la composición de éstos.

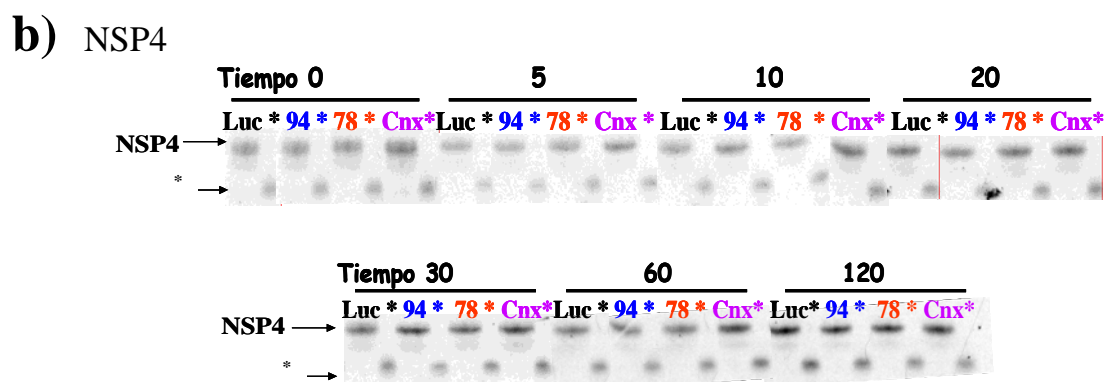
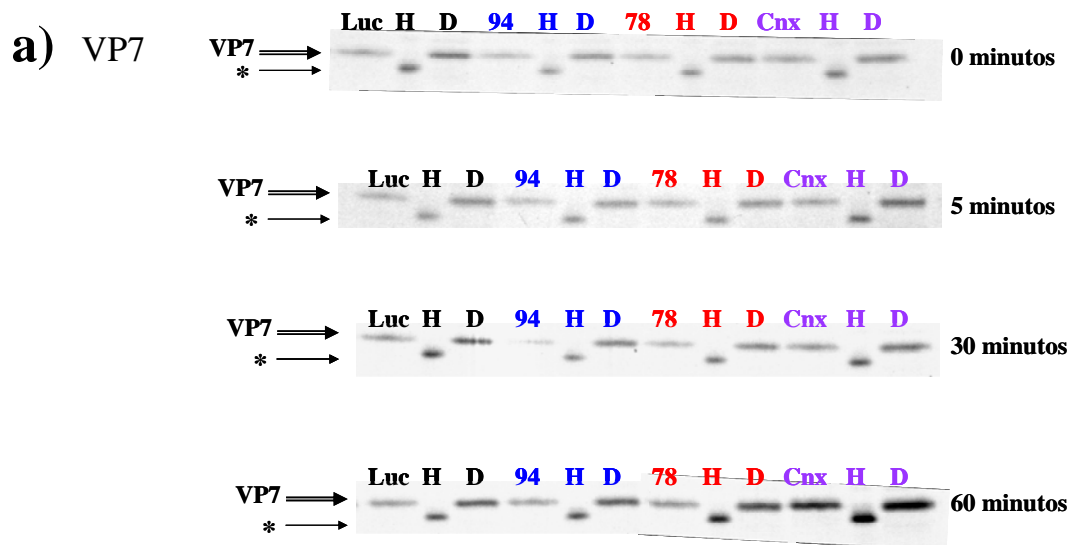


Figura 21. Tratamiento de las glicoproteínas virales a)VP7 y b)NSP4 con la Endoglicosidasa H y Endoglicosidasa D. Interferimos a las chaperonas moleculares grp94, Grp78 y Calnexina, a las 72 h post-transfección infectamos, y a las 7 hpi dimos un pulso de 5 min con metionina marcada [³⁵S], posteriormente una caza con un exceso de metionina fría y cicloheximida para detener la traducción de las proteínas, luego lisamos a las células a diferentes tiempos (0, 5, 10, 20, 30, 60 y 120 min), e inmunoprecipitamos a las glicoproteínas del virus VP7 y NSP4, posteriormente lavamos y tratamos a las proteínas que están unidas a la proteína A sefarosa con 5 mU de Endoglicosidasa H o EndoD, 25ml Acetato de Sodio 50mM pH 5.5 y 0.01% SDS durante 4 horas a 37°C, las proteínas se resolvieron en un gel SDS-PAGE 12% y se revelaron por autoradiografía. En la figura las que están marcadas con * y H son las muestras digeridas con Endoglicosidasa H y marcadas con D las que están digeridas con Endoglicosidasa D.

Otro dato que notamos al silenciar a calnexina, fue que la cantidad de VP7 detectada con el anticuerpo monoclonal MAb 60 disminuyó importantemente desde el principio de la síntesis, aproximadamente 25% y un 40% a partir e los 30 min de caza, manteniéndose así hasta los 120 min. Para descartar la posible degradación de VP7 en estas condiciones, la VP7 presente en los geles de proteína total y la inmunoprecipitada, fueron cuantificadas por densitometría (Figura 6B del artículo pag. 127 [Anexo I]). Estos resultados sugieren que una parte de la población de VP7 presenta cambios conformacionales y, es por esto, que el anticuerpo no la reconoce y se obtiene menor cantidad de proteína. Además los datos sugieren que los puentes disulfuro de la glicoproteína VP7, no se forman adecuadamente en ausencia de calnexina, al menos durante las dos horas de caza

en las que fue evaluada la proteína. Cabe mencionar que las proteínas totales, así como las inmunoprecipitaciones de todos los experimentos mostrados en este trabajo, fueron evaluadas en condiciones reductoras y no reductoras, y en todos los casos en donde silenciamos a las chaperonas moleculares observamos formación de puentes disulfuro en VP7, por lo que sí hubo formación de puentes disulfuro, pero éstos presentaron algún cambio o rearrreglo al silenciar a calnexina, de manera que el anticuerpo no reconoció a toda la VP7 sintetizada.

No se ha reportado en la literatura que calnexina tenga actividad disulfuro isomerasa, por lo que, para determinar qué proteína disulfuro isomerasa está involucrada en la formación de los puentes disulfuro de VP7, las células fueron transfectadas con los siRNAs contra las disulfuro isomerasas ERP57 y PDI; la primera está involucrada en el ciclo calnexina-calreticulina (Helenius and Aebi 2001) y, la segunda interactúa con VP7 (Mirazimi and Svensson 1998) y se ha propuesto que juega un papel en el ciclo de Grp78 (Meunier et al. 2002); 72 horas después de la transfección, las células fueron infectadas y 8 horas después, el mismo protocolo de pulso-caza descrito anteriormente fue empleado para marcar a las proteínas sintetizadas. Finalmente la proteína VP7 fue inmunoprecipitada con el anticuerpo MAb 60, separada en SDS-PAGE 12% en condición reductora y revelada por autoradiografía (Figura 7 del artículo pag. 128 [Anexo I]).

Observamos que, inmunoprecipitó una menor cantidad de VP7 cuando silenciamos PDI, pero no en bajos niveles de ERp57. La disminución de VP7 inmunoprecipitada en ausencia de PDI no se debió a la degradación de la proteína, ya que la cantidad de proteína total antes de inmunoprecipitarla fue la misma al silenciar PDI que la del control. Estos resultados sugieren que la formación incorrecta de los puentes disulfuro en VP7 en presencia del siRNA contra Calnexina, no fue debido a ERp57.

Por otro lado, también analizamos la cantidad y la movilidad de VP7 inmunoprecipitada al silenciar calreticulina, ya que previamente habíamos observado que en bajos niveles de esta proteína, disminuía la progenie viral infecciosa de rotavirus. Como se observa en la Figura 7 del artículo pag. 128, no hubo cambios en la movilidad de VP7 al silenciar a calreticulina; sin embargo, la cantidad de VP7 inmunoprecipitada con el MAb 60 aumentó durante todos los tiempos de caza al compararla con el control. Estos resultados sugieren que en bajos niveles de calreticulina, la cantidad de VP7 detectada con el anticuerpo y consecuentemente la velocidad de formación de los puentes disulfuro en VP7 aumenta.

Para probar si el anticuerpo MAb 60 estaba funcionando como se reporta en la literatura, decidimos hacer un experimento en el cual tratamos a las células con o sin DTT, marcamos durante 10 min con metionina [³⁵S] y cazamos a diferentes tiempos. Este tratamiento afecta la formación de los puentes disulfuro de las proteínas. En estas condiciones inmunoprecipitamos con dos anticuerpos que reconocen a VP7; el MAb 60 que sólo reconoce la forma plegada de VP7 y un

anticuerpo policlonal de conejo C11 que reconoce el total de esta proteína independientemente de su plegamiento (Figura 22).

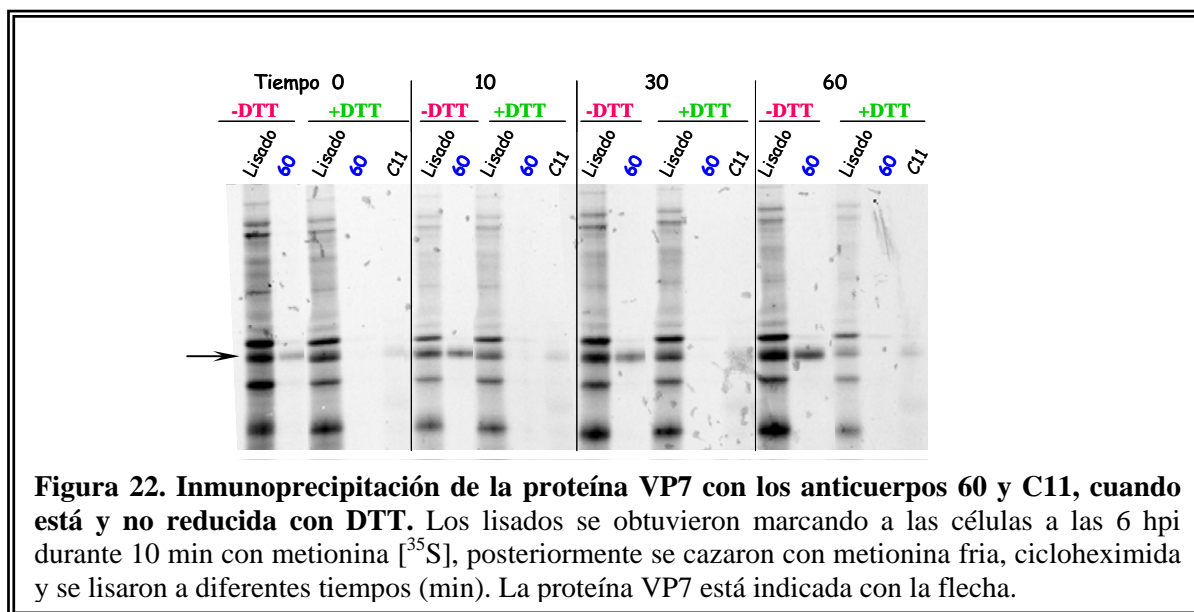


Figura 22. Inmunoprecipitación de la proteína VP7 con los anticuerpos 60 y C11, cuando está y no reducida con DTT. Los lisados se obtuvieron marcando a las células a las 6 hpi durante 10 min con metionina [³⁵S], posteriormente se cazaron con metionina fría, cicloheximida y se lisaron a diferentes tiempos (min). La proteína VP7 está indicada con la flecha.

Cuando tratamos a las células con DTT, no detectamos a VP7 al inmunoprecipitarla con el anticuerpo MAb60; sin embargo, sí se detecta al inmunoprecipitarla con el C11 en las mismas condiciones. Estos resultados confirman que el MAb 60 reconoce solamente a la proteína viral VP7 que forma puentes disulfuro.

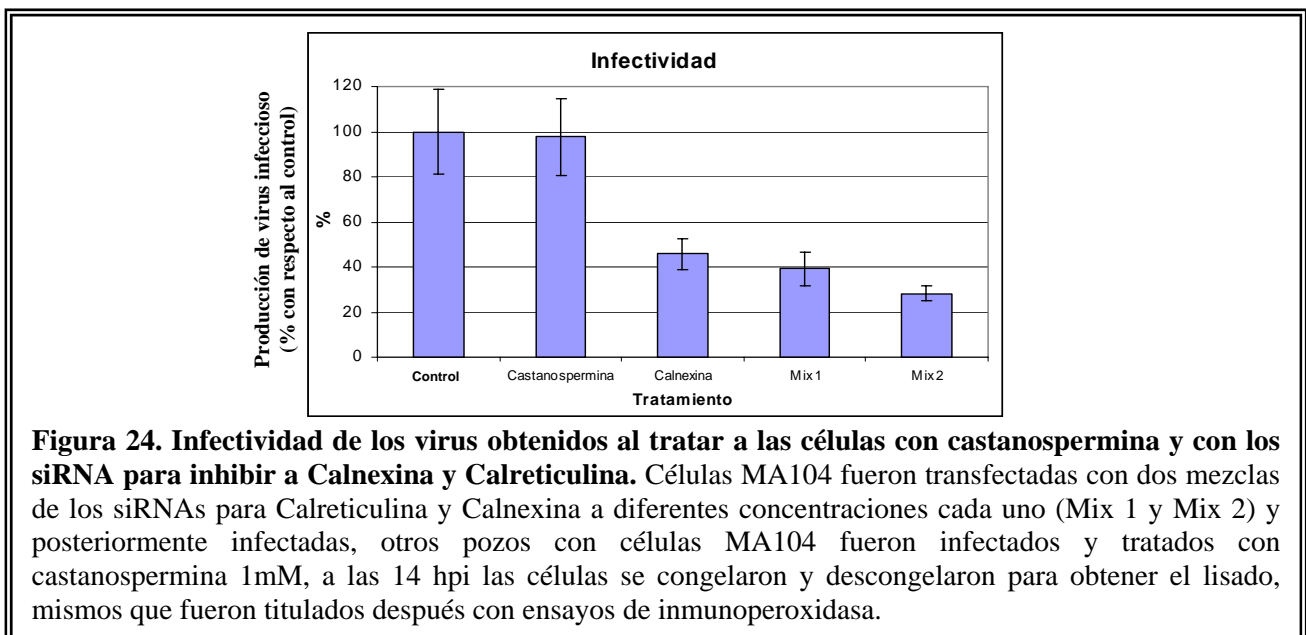
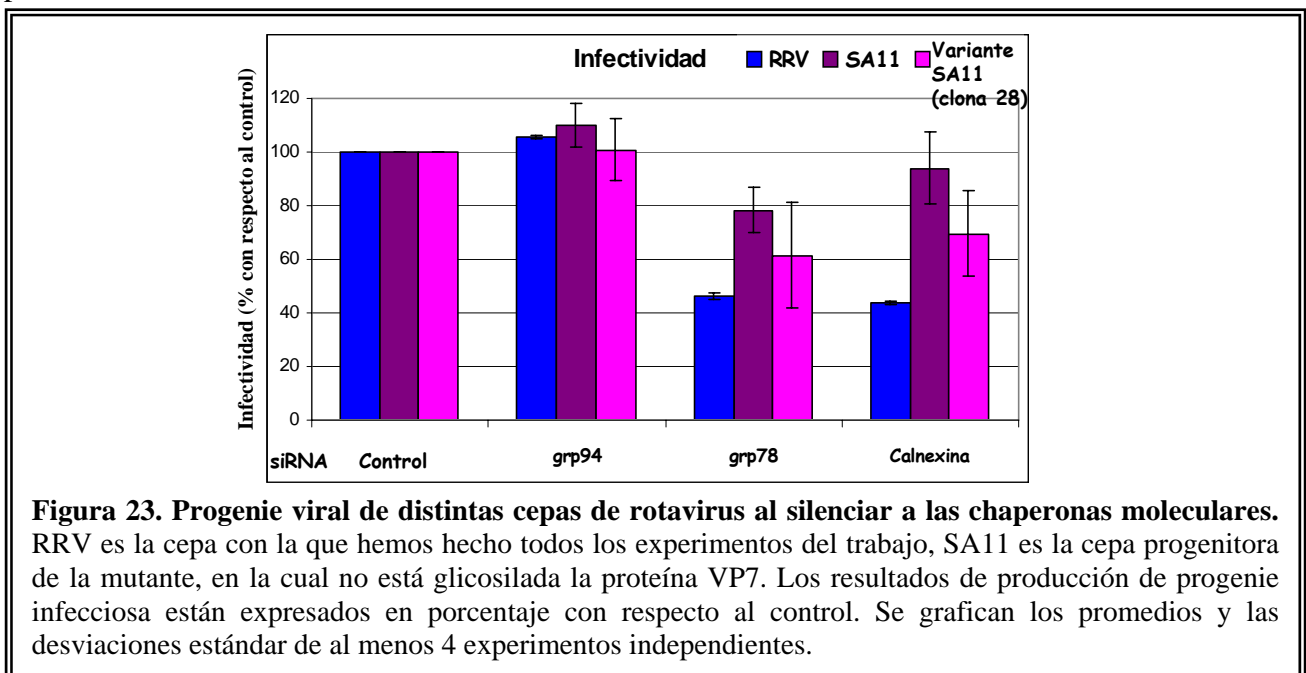
Hasta este punto sabíamos que al silenciar Grp78, el procesamiento de los oligosacáridos de las proteínas virales VP7 y NSP4 era retrasado y éste parecía acelerarse al silenciar a calnexina, además la cinética de formación de dímeros de NSP4 también cambió; por lo que, decidimos también evaluar el fenotipo al silenciar a las chaperonas en una cepa mutante de rotavirus, la cepa SA11 (Clona 28), en la cual la proteína VP7 no está glicosilada (Figura 23).

En estos ensayos encontramos que tanto en la cepa silvestre, como en la mutante (no se glicosila VP7), la progenie viral disminuyó en células en las que se silenció Grp78 y Calnexina. Además podemos observar que aunque RRV y SA11 sean ambas cepas de rotavirus que infectan a simios, estas cepas presentan distinta susceptibilidad en la formación de progenie viral infecciosa durante la ausencia de las chaperonas moleculares.

Con estos resultados podemos concluir que el retraso en el procesamiento de la glicosilación de VP7 no es suficiente para explicar el por qué la infectividad del virus disminuye en ausencia de las chaperonas moleculares.

Por otro lado, existe un reporte (Mirazimi et al. 1998), en el que infectan a las células MA104 con RRV y utilizan castanospermina para ver si se afecta la interacción entre NSP4 y calnexina. Dado que se ha postulado que calnexina y calreticulina reconocen a proteínas monoglicosiladas, entonces el tratamiento con castanospermina que inhibe a las glicosidasas (I yII) que se encuentran en RE (ver Figura 2), debería bloquear la interacción de calnexina y calreticulina

con la proteína no monoglucosilada. En este trabajo reportan que al tratar a las células con esta droga, calnexina ya no interactúa con NSP4 y, el rendimiento viral se afecta un 25%, con lo que concluyen que calnexina no es una proteína importante para plegamiento y ensamble de rotavirus. Sin embargo, esto difiere de lo que obtuvimos al silenciar la expresión de calnexina y calreticulina, ya que el rendimiento viral disminuyó en aproximadamente 60% al silenciar a cada una de estas proteínas. Para explicar por qué ocurre esto, una idea es que si se bloquea ya sea a calnexina o a calreticulina por separado, la otra chaperona que queda perteneciente al mismo sistema cause que la producción de la progenie viral disminuya; sin embargo, si las dos chaperonas de este sistema son bloqueadas, como al utilizar castanospermina, entonces una chaperona diferente de las anteriores como pudiera ser Grp78, podría rescatar el plegamiento de las proteínas virales y resultar en la producción de virus infeccioso.



Para probar esta posibilidad, tratamos a las células con castanospermina y evaluamos el efecto de esta droga en la infectividad viral, además silenciamos al mismo tiempo a las dos chaperonas calnexina y calreticulina con los siRNAs, para analizar el efecto de la ausencia de ambas proteínas celulares en la producción de progenie viral infecciosa (Figura 24).

En estos experimentos observamos que en las células tratadas con castanospermina el título viral no se afectó, lo que coincide con lo reportado anteriormente (Mirazimi et al. 1998), en contraste, al utilizar los siRNAs para silenciar a calnexina y calreticulina al mismo tiempo, la infectividad disminuyó aproximadamente 75%, inhibición que es aun mayor que cuando interferimos a estos genes individualmente. Estos resultados sugieren que no es la inhibición de ambas lectinas a la vez lo que provoca que la progenie viral no se vea afectada.

Las partículas virales ensambladas en ausencia de las chaperonas moleculares presentan cambios en el plegamiento de VP7

Al observar que al silenciar a Grp78, calnexina, calreticulina y PDI, las proteínas virales sintetizadas en el RE, VP7 y NSP4, presentaban cambios en su plegamiento, decidimos evaluar si la proteína estructural VP7 que forma parte de la partícula infecciosa también se encontraba mal plegada. Para ésto, purificamos TLPs a partir de células en las que se silenciaron las chaperonas indicadas. Las TLPs purificadas se trataron con EGTA durante 15 min para separar de la partícula a las proteínas de la capa externa VP4 y VP7. Posteriormente, estas muestras se inmunoprecipitaron con el anticuerpo MAb60 que reconoce a VP7 y las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida 12%, del cual obtuvimos una autoradiografía (Figura 8 del artículo pag. 129 [Anexo I]).

Como podemos observar, al inmunoprecipitar VP7 de partículas completas obtuvimos una menor cantidad de esta proteína en contraste con la cantidad que obtenemos al tratar a las partículas con EGTA y liberar a la proteína.

Por otro lado, observamos que la cantidad de VP7 que logramos inmunoprecipitar en partículas no tratadas con EGTA disminuyó en aquellas partículas que obtuvimos de células en las que silenciamos a las chaperonas moleculares, lo que sugiere que la VP7 que se encuentra en las partículas está ensamblada de forma alterada, por lo que el anticuerpo no la reconoce bien. Lo anterior ocurre en todos los casos; sin embargo, es más evidente al silenciar a Grp78 y a calreticulina. Otro dato importante que observamos es que al tratar con EGTA a las partículas que se purificaron de células en donde calnexina y PDI estaban silenciadas, observamos un menor reconocimiento del anticuerpo por VP7, lo cual coincide con los experimentos anteriores al analizar a la proteína total (Figura 6 del artículo pag. 127).

Un resultado interesante es que cuando inmunoprecipitamos a la VP7 de partículas aisladas de células en las que silenciamos a calreticulina observamos que estas partículas tienen cierto grado de resistencia al tratamiento con EGTA, ya que en esta condición inmunoprecipitamos también otras proteínas estructurales del virus. Estos resultados sugieren que VP7 tiene un plegamiento y ensamblaje en la partícula diferente a las control al haber bajos niveles de calreticulina.

Estos resultados confirman que las partículas virales ensambladas en ausencia de estas chaperonas moleculares, presentan cambios en su ensamblaje.

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo.

Características evaluadas \ siRNA	Grp94	Grp78	PDI	calnexina	calreticulina	ERp57
Producción de progenie viral	=	--	-	--	--	=
Cambio de distribución por la infección	C	NE	C	SC	C	NE
Cantidad de TLPs ensambladas	=	+++	NE	++	NE	NE
Infectividad específica de TLPs	=	--	NE	--	NE	NE
Unión de las TLPs con la célula	=	--	NE	=	NE	NE
Susceptibilidad a EGTA	=	++	NE	++	NE	NE
Susceptibilidad a aumento de temperatura	=	++	NE	--	NE	NE
Procesamiento de oligosacáridos de VP7 y NSP4	=	R	=	A	=	=
Formación adecuada de los puentes disulfuro de VP7	=	=	--	--	++	=
Formación de puentes disulfuro en las TLPs	NE	=	--	--	=	=
Accesibilidad del MAb60 a la VP7 en las TLPs	NE	---	--	--	---	-

Símbolo Significado

=	No cambia al compararlo con el control
-	Disminución de 25%
--	Disminución de 50%
---	Disminución de 75%
+	Poco aumento
++	Aumento medio

Símbolo Significado

+++	Aumento mayor
C	Cambia
SN	Sin cambio
NE	No evaluado
R	Retraso
A	Aceleración

DISCUSION

Poco se sabe acerca del ensamble de rotavirus en el RE y mucho menos de las proteínas celulares que interaccionan con las proteínas virales y que son requeridas para que el proceso de morfogénesis del virus se lleve a cabo. Previamente se había descrito que algunas chaperonas moleculares interaccionaban con polipéptidos virales (Mirazimi et al. 1998; Mirazimi and Svensson 2000; Xu et al. 1998). Sin embargo, el papel de estas interacciones sobre el ensamble del virus no ha sido claramente establecido.

En este trabajo encontramos que hay una redistribución de las chaperonas moleculares luminales Grp94, PDI y calreticulina en el RE que es dependiente del tiempo de infección con rotavirus; acumulándose alrededor de NSP4 y VP7. Una posibilidad del por qué ocurre esto en las células infectadas puede ser porque a las 6 hpi aumenta la síntesis de proteínas virales y también aumenta la cantidad de DLPs que geman al RE para dar lugar al ensamble del virión maduro y que por ello, la cantidad de chaperonas moleculares y su acercamiento a los sitios de ensamble viral sea determinante para mantener la homeostasis celular y el plegamiento de las proteínas virales.

El reclutamiento de las chaperonas durante la infección es una observación interesante, ya que se ha propuesto que los complejos o sistemas formados por las chaperonas serían complejos poco dinámicos, muy estructurados y con posiciones determinadas dentro del RE. Sin embargo, nuestros resultados, así como resultados previos (Snapp et al. 2006) sugieren que no es así y que son dinámicos.

Calnexina es una proteína transmembranal del RE y previamente se ha descrito que colocaliza con proteínas virales que se sintetizan en RE como NSP4 (Kabcenell et al. 1988); sin embargo, en este trabajo no se detectó esa colocalización. Solamente observamos que NSP4 y calnexina se encuentran muy cercanas y con una disposición reticular. Esta diferencia podría deberse a que los anticuerpos utilizados, las cepas evaluadas, y los tiempos post-infección fueron distintos.

Con el propósito de probar si las funciones de algunas chaperonas moleculares, miembros de los dos sistemas de plegamiento en el RE, tenían un papel en el ensamble de rotavirus, la expresión de Grp94, Grp78, PDI, calnexina, calreticulina y ERp57 fue silenciada utilizando RNA de interferencia. Utilizando los siRNAs correspondientes fuimos capaces de disminuir el nivel de RNA mensajero y proteína de cada una de las chaperonas moleculares. Además, analizamos los niveles de cada una de las chaperonas estudiadas, al silenciar a cada una de ellas (Figura 2 del artículo). El nivel de expresión de las chaperonas evaluadas, permaneció sin variación al silenciar a Grp94, PDI, Calnexina y ERp57, lo cual coincide con reportes previos (Molinari et al. 2004; Pieren et al. 2005;

Solda et al. 2006). Encontramos que al disminuir los niveles de Grp78, los niveles de las otras chaperonas analizadas se incrementan, a excepción de calnexina. Las posibles explicaciones de este fenómeno pueden ser varias. Una posibilidad es que como Grp78 es una proteína que se requiere para mantener la viabilidad de la célula (Li and Lee 1991; Rose et al. 1989; Yu et al. 1999), se de una compensación de la ausencia de esta proteína para mantener la homeóstasis, por lo que se induce la transcripción y la traducción de Grp94, PDI, calreticulina y ERp57. Aunado a esto, sabemos que estas proteínas actúan de manera secuencial en muchos de sus sustratos y se propone que en ausencia de alguna de ellas, otra podría suplir su función (Delom et al. 2001; Hammond and Helenius 1994a). Otra posibilidad y, la más probable, es que los resultados reflejen un efecto a nivel de regulación de la UPR, ya que en condiciones normales, Grp78 está unida al factor transcripcional 6 (ATF6), el cual a su vez se encarga de inducir la expresión de chaperonas moleculares como Grp78, Grp94 y calreticulina. Consistente con ello, los genes que codifican para estas chaperonas contienen un elemento de respuesta a estrés (ERSE por sus siglas en inglés, con el motivo: CCAAT(N9)CCACG) en su promotor que es activado por ATF6 (Yoshida et al. 1998). De esta manera cuando Grp78 es silenciada, es posible que ATF6 sea liberado e induzca la activación transcripcional de algunas chaperonas moleculares.

Probablemente no se observa una inducción de calnexina porque no tiene sitios ERSE en su promotor y tampoco pertenece a la familia de proteínas reguladas por glucosa (GRP) (Kaufman 1999).

Para analizar si cuando silenciábamos a Grp78 estábamos induciendo una UPR, decidimos evaluar la activación e inducción de algunos genes de estrés (Figuras 29 y 31) y obtuvimos resultados interesantes, porque a pesar que Grp78 ha sido propuesto como el regulador maestro de UPR en el RE por estar unido a los tres efectores que desencadenan esta respuesta, encontramos que al silenciar esta chaperona solamente se indujeron los genes de chaperonas moleculares que son inducidos vía ATF6 y no aquellos genes que son inducidos vía Ire1 como EDEM y el procesamiento de XBP-1, y por la vía de PERK como CHOP y la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 α . Aunado a esto, previamente han reportado que los tres efectores de UPR responden diferente al silenciamiento de Grp78 y sugieren que existen distintos mecanismos que regulan su activación (Donati et al. 2006; Zu et al. 2006). Con los resultados obtenidos, podemos concluir que este proceso debe estar altamente regulado y que es posible que haya otras proteínas involucradas en mantener el equilibrio bajo diferentes condiciones de estrés y de regular los niveles de Grp78. En conjunto los resultados obtenidos sugieren que cuando silenciamos a Grp78, se estaría activando la vía de ATF6, pero no se desencadenaría una UPR completa como la que se observa al tratar con drogas que desestabilizan la concentración de calcio en el RE.

Por otro lado, cuando calreticulina fue silenciada, los niveles de proteína de Grp94 y PDI y el RNA mensajero de ERp57 aumentaron. Esto podría deberse a que en condiciones normales, calreticulina está unida a ATF6 (Hong et al. 2004), de tal manera que cuando el nivel de calreticulina disminuye, ATF6 podría liberarse y activarse para inducir la expresión de estas chaperonas moleculares. Sin embargo, no sabemos si ATF6 se activa en estas condiciones, ya que hubiéramos esperado que el mensajero de todas las chaperonas evaluadas excepto el de calnexina aumentaran sus niveles de expresión y, sin embargo, no observamos eso.

Es importante mencionar que algunos genes como el de Grp78 requieren de mayor regulación porque poseen en su promotor secuencias que pueden ser reconocidas por otros factores activadores de la transcripción que están involucrados en su regulación (Donati et al. 2006), por lo que pudiera ser que la ausencia de calreticulina no fuese suficiente para inducir su expresión. Estos resultados abren la posibilidad de que calreticulina tenga un papel en la regulación de las chaperonas, a través de ATF6, además de la ya descrita para Grp78 (Shen et al. 2002). Otra posibilidad podría ser que la activación de otros factores de plegamiento, se inducieran para compensar la disminución de calreticulina por un mecanismo desconocido. En reportes previos en los cuales utilizan fibroblastos de embrión de ratón (MEF) deficientes en calreticulina, observaron que la expresión de Grp78 aumenta 1.5 veces, pero no aumentan otras chaperonas, lo que sugiere que las diferencias pueden deberse a que la respuesta sea diferente dependiendo del tipo de línea celular, nivel al cual la chaperona sea disminuida y del tiempo que pase antes de evaluarlas (Molinari et al. 2004).

Al silenciar a calreticulina observamos que el nivel de RNA mensajero de ERp57 aumenta, pero no la proteína, por lo que es posible que bajo esta condición, la traducción de ERp57 esté regulada y por esta razón sólo observemos que el nivel de mensajero aumenta, pero no el nivel de proteína.

Resumiendo esta parte, podemos decir que bajo condiciones en las que las chaperonas moleculares fueron silenciadas, no hubo una inducción de la UPR, excepto al silenciar a Grp78 y a calreticulina.

Por otro lado, al hacer experimentos para evaluar si se activaba la UPR con la infección por rotavirus, encontramos que se disparó una UPR en la cual se activaron las vías de ATF6, Ire-1 y PERK. Encontramos que se da la inducción de las chaperonas moleculares Grp78, Grp94 y PDI desde 1 hpi (tabla 5), el procesamiento de XBP-1 desde las 3 hpi, la inducción de CHOP a las 6 hpi (Figuras 27 y 28) y la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 α (datos del laboratorio). Sin embargo, también observamos que la infección podría estar modulando esta

respuesta al regular la expresión de algunos genes de estrés. Por ejemplo no se inducen EDEM y p58. El primero es un gen que codifica para una proteína de degradación y el segundo es un gen que codifica para una proteína que funciona inactivando a PERK. Estos resultados sugieren que la inducción de la UPR por la infección con rotavirus puede ser modulada a diferentes niveles bajo estas condiciones de infección, como sucede con la infección por otros virus como son reovirus y coronavirus (Chan et al. 2006; Smith et al. 2006).

Al silenciar a Grp78 observamos que hay una redistribución de las proteínas tanto virales como celulares que se encuentran en el RE, además de las proteínas virales que se encuentran en viroplasma. La presencia de esta proteína o sus funciones parecen ser muy importantes para darle estabilidad al RE. Es importante señalar que a pesar del cambio de distribución que sufren las proteínas este organelo, las partículas virales se siguen ensamblando, por lo que esto parecería no afectar drásticamente las funciones que ocurren en este compartimiento. Además para comprobar que las funciones del RE no se estuvieran afectando drásticamente en ausencia de Grp78, utilizamos a influenza como modelo y por ensayos de hemaglutinación encontramos que el plegamiento de la proteína HA que se pliega en el RE no se afectó al silenciar a Grp78. Previamente se había descrito que puede haber una fragmentación del RE, al tratar con agentes que desestabilizan la concentración del calcio en este compartimiento, como el ionoforo A23187 y la tapsigargina (Koch et al. 1988). Se cree que es debido a alteraciones en la concentración de calcio que esto puede ocurrir. Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que proteínas que no dependen de grp78 para su plegamiento, pueden plegarse adecuadamente en bajos niveles de esta proteína; por lo que al menos en esta condición el control de calidad en RE no estaría comprometido. Adicionalmente, esta proteína podría tener funciones importantes para la distribución de otras proteínas y para dar estabilidad al RE.

La ausencia de chaperonas moleculares afecta el ensamble de rotavirus.

Interesantemente, a pesar de la posibilidad de ensamblar partículas virales infecciosas *in vitro*, bajo condiciones adecuadas de pH y concentraciones de calcio (Trask and Dormitzer 2006), *in vivo* la presencia de chaperonas moleculares del RE es requerida para que las proteínas que se están sintetizando *de novo* adquirieran un plegamiento adecuado y no formen agregados. En este sentido se ha reportado que durante la infección con rotavirus, algunas chaperonas moleculares inducen sus niveles de expresión (Xu et al. 1998) e interaccionan con algunos polipéptidos virales (Mirazimi et al. 1998; Xu et al. 1998), por lo que la presencia de estas proteínas celulares en altos niveles durante la infección podría ser importante tanto para el plegamiento de las proteínas virales, como para que no se diera un estrés tan fuerte que llevara rápidamente a las células a apoptosis.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos proponer que a pesar de que Grp94 interacciona con polipéptidos del virus (Xu et al. 1998) y es reclutada hacia donde se encuentran las proteínas virales, la presencia de esta proteína no es importante para el plegamiento adecuado de las glicoproteínas virales y por ende para la producción de progenie viral infecciosa. Esto podría deberse a que Grp94 no fuera una proteína esencial y/o que otra chaperona pudiese sustituir su función. Es probable que en este caso Grp94 esté actuando como su homóloga en el citosol, hsp90, formando un complejo de andamiaje (Buchner 1999) para otras chaperonas moleculares y, de esta manera ayude a mantener la homeostasis de la célula, pero no esté involucrada directamente en el plegamiento de las proteínas virales y por lo tanto en el ensamble de los virus infecciosos.

Por otro lado, también podemos proponer que la presencia de Grp78 durante la infección con rotavirus es importante, ya que además de interactuar con VP7 y VP4, principalmente, durante los primeros 30 min de síntesis (Xu et al. 1998), ayuda a que el procesamiento de los oligosacáridos de VP7 y NSP4 sea completo y a que se dé el plegamiento correcto de las proteínas virales, manteniendo el control de calidad en el RE para que las partículas ensambladas no se modifiquen estructuralmente, logrando unirse a las células huésped y de esta manera infectarlas. Por otro lado, aún con bajos niveles de Grp78 en las células y altos niveles de otras chaperonas, se da la formación de los puentes disulfuro de VP7, proceso que requiere de PDI, por lo que estos resultados sugieren que a pesar que Grp78 y PDI pertenecen al mismo sistema de plegamiento en el RE, la interacción de Grp78 con el sustrato no sería necesaria para que PDI pudiera interactuar con él y así formar correctamente los puentes disulfuro.

Observamos que al silenciar a calnexina, disminuye la infectividad del virus aproximadamente un 50%; sin embargo, esto no pasa cuando tratan a las células con CST después de lo cual ya no hay interacción entre calnexina y NSP4, en estas condiciones la infectividad disminuye solamente un 25% (Mirazimi et al. 1998). Una posible explicación a esto es que calnexina no siempre necesita interactuar con una proteína por medio de los N-oligosacáridos (Cannon et al. 1996; Rajagopalan and Brenner 1994; van Leeuwen and Kearse 1996; Ware et al. 1995), por lo que se pudiera estar uniendo con NSP4 u otras proteínas virales con una interacción muy débil y por un tiempo breve, por lo que no pudiera haber sido detectada en esos experimentos. De tal manera que al tratar con CST no se bloqueara del todo la interacción de calnexina con NSP4 y, por lo tanto, no se afectara la producción de virus infeccioso, como ocurre con las glicoproteínas de HCV (Choukhi et al. 1998). Nuestros resultados sugieren que la presencia de calnexina es importante para mantener el plegamiento adecuado de las proteínas virales y para el ensamble correcto de las partículas infecciosas. Observamos que esta proteína está involucrada en el

plegamiento correcto de VP7 y las interacciones de esta glicoproteína viral con PDI para formar correctamente los puentes disulfuro.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los puentes disulfuro en VP7 sufren rearrreglos más rápidos en ausencia de calreticulina, aunque no necesariamente correctos, como ocurre en fibroblastos de embriones de ratón carentes de calreticulina en donde incrementa la velocidad en el plegamiento de la proteína HA de influenza y las proteínas p62/E1 de SFV. (Molinari et al. 2004). Además, las partículas virales ensambladas en ausencia de esta proteína presentan cambios conformacionales, lo que sugiere que esta chaperona es importante para la morfogénesis de rotavirus.

Previamente se había propuesto que el procesamiento de los glicosacáridos de VP7 ocurría después de la formación de los puentes disulfuro (Svensson et al. 1994), con los resultados obtenidos en este trabajo encontramos que no es necesario que los puentes disulfuro se formen correctamente para que se pueda dar el procesamiento en los oligosacáridos de VP7. Además, aunque los puentes disulfuro se forman casi inmediatamente después de ser traducida la proteína, hay un arreglo o cambio que mejora su reconocimiento después de los 30 min.

En cuanto a los dos sistemas de plegamiento propuestos para el RE (Ma and Hendershot 2004; Molinari et al. 2004), podemos concluir que bajos niveles de los miembros de ambos sistemas afectan importantemente la producción de progenie viral infecciosa. Por lo que rotavirus estaría utilizando para la formación de virus infeccioso, de forma directa o indirecta, a miembros de los dos sistemas propuestos, específicamente, de un sistema a Grp78 y PDI y, del otro sistema a calnexina y calreticulina, no afectándole la ausencia de Grp94, perteneciente al primer sistema, y de ERp57, que actúa en el segundo sistema.

Además, ya que NSP4 interacciona con calnexina, podría ser que esta proteína estuviera siendo plegada por este sistema, y ya que VP7 y VP4 interaccionan con Grp78 y PDI, pudieran estar utilizando este sistema para plegarse. Adicionalmente, se ha reportado que los sistemas de calreticulina-calnexina y el de Grp78, podrían actuar secuencialmente para prevenir el transporte de proteínas mal plegadas (Cabral et al. 2002; Ma and Hendershot 2004; Molinari et al. 2002; Molinari and Sitia 2005); por que, nuestros resultados sugieren que ambos sistemas están involucrados en el proceso de ensamble de rotavirus.

Anteriormente se propuso que en células polarizadas Caco2, el ensamble de la proteína viral VP4 a la partícula viral podría darse durante la salida del virus en la membrana celular (Sapin et al. 2002); sin embargo, en células no polarizadas MA104, ése no parecería ser el caso. Nuestros resultados refuerzan estas evidencias, ya que el ensamble que determina la producción de partículas

virales para que sean infecciosas (al menos en esta línea celular) se lleva a cabo en el RE, en el que además de participar proteínas virales se requiere de chaperonas moleculares.

Es importante señalar, que los resultados que obtuvimos al utilizar RNA de interferencia contra cada una de las chaperonas y enzimas de plegamiento, no se parecen a los resultados que se obtienen al utilizar drogas que detienen la morfogénesis como lo son tapsigargina, DTT, tunicamicina y brefeldina, ya que estas drogas, provocan una acumulación de partículas envueltas, lo cual posiblemente se deba a que el efecto que tienen sobre la célula dañe otras vía además de la función atribuida, por lo que el empleo de siRNAs es una herramienta que resulta de gran utilidad para conocer de manera más precisa, si la presencia de determinadas proteínas celulares afecta la infección, en este caso de rotavirus.

Por otro lado, se puede conocer más acerca de la función de las chaperonas moleculares del RE en el contexto de la infección, utilizando como modelo proteínas virales, por ejemplo, la proteína HA de influenza, la proteína G de VSV, y las proteínas p62 y E1 de Sindbis Virus, han sido estudiadas y se han identificando algunas de las propiedades de Grp78, PDI, calnexina y calreticulina (Molinari and Sitia 2005). Además de los virus modelo, solamente se han identificado algunas proteínas de otros virus que interactúan con chaperonas (Dubuisson and Rice 1996; Earl et al. 1991; Gaudin 1997; Hammond and Helenius 1994a; Hurlley et al. 1989; Otteken and Moss 1996; Peterson et al. 1995; Yamashita et al. 1996); sin embargo, no se ha descrito que estas interacciones sean importantes para su correcto plegamiento y ensamble. Nuestro trabajo abre la posibilidad de utilizar a rotavirus y, específicamente, a las proteínas de la capa externa, como modelo para contribuir con el estudio de proteínas como Grp78, PDI, calnexina y calreticulina, ya que sus glicoproteínas son sintetizadas en el RE y la partícula infecciosa se ensambla en este compartimiento.

En resumen, nuestros resultados amplían el conocimiento acerca del papel de algunas chaperonas y enzimas de plegamiento en la morfogénesis de rotavirus en el RE. Encontrando que al disminuir los niveles de Grp78, PDI, calnexina y calreticulina, la producción de virus infeccioso disminuye, ya que estas chaperonas moleculares son proteínas necesarias para mantener el control de calidad en el RE, para que se dé el plegamiento correcto de las proteínas virales, un procesamiento completo de los oligosacáridos de las glicoproteínas virales, además la formación de puentes disulfuro en VP7 y el ensamble de partículas virales infecciosas.

CONCLUSIONES

- ✿ Las chaperonas moleculares (Grp78, PDI, calnexina y calreticulina) miembros de los dos sistemas de plegamiento propuestos para el RE, participan en el proceso de morfogénesis de rotavirus.
- ✿ La producción de progenie viral infecciosa disminuye en bajas concentraciones de Grp78 lo que muy probablemente se deba a que el procesamiento de las proteínas virales de RE se retrasa y las partículas ensambladas en estas condiciones presentan cambios conformacionales que les impiden unirse a las células. En este sentido, es probable que al silenciar Grp78 el control de calidad del RE sea alterado, por lo que se ensamblen más partículas virales con menor infectividad.
- ✿ La presencia de calnexina en las células es importante para que se produzcan virus infecciosos, ya que en ausencia de ésta, las partículas que se ensamblan tienen una baja infectividad específica, lo que se debe a una deficiencia estructural que las afecta muy probablemente en un paso posterior a la unión con la célula. Es posible que la formación incorrecta de los puentes disulfuro en VP7, provoque esta deficiencia en el ensamble de las partículas.
- ✿ La presencia de PDI en las células es importante para la formación de progenie viral infecciosa, ya que es la proteína disulfuro isomerasa que arregla los puentes disulfuro de la glicoproteína viral VP7.
- ✿ La progenie viral infecciosa disminuye al silenciar la expresión de calreticulina, lo que muy probablemente se debe a una aceleración en la formación de los puentes disulfuro de VP7, lo que sugiere una aceleración en el plegamiento y ensamble de virus defectuosos, como previamente se ha reportado para otros virus.
- ✿ El silenciamiento de Grp94 y ERp57 no afecta la producción de progenie viral infecciosa, a pesar de que la primera se puede unir con algunos péptidos virales y es reclutada muy cerca de las proteínas virales de RE, por lo que posiblemente tenga una función de andamiaje que resulte no esencial para el plegamiento de las proteínas virales y el ensamble de virus infeccioso.
- ✿ Las chaperonas moleculares no parecen tener ninguna función como receptores de rotavirus en la entrada del mismo.

- ✿ Por otro lado, encontramos que al silenciar el gen de Grp78 en las células MA104, provocamos una activación de la respuesta a proteínas no plegadas en el RE (UPR). Sin embargo, no se observa una respuesta de UPR completa, lo que sugiere que este proceso se encuentra altamente regulado. Y probablemente haya otras proteínas involucradas en el proceso de activación de la respuesta, como podría ser el caso de Calreticulina.
- ✿ Los resultados obtenidos sugieren que es posible que Grp78 tenga una función adicional en mantener la organización normal del RE, ya que proteínas marcadoras del RE, así como las proteínas virales que se sintetizan en este compartimiento, sufren un cambio en su distribución en bajos niveles de Grp78.

PERSPECTIVAS

- ✿ Evaluar la cinética de interacción de las chaperonas de RE con las proteínas virales, tanto en condiciones normales como al silenciar a las chaperonas moleculares. Esto con la finalidad de establecer la secuencia de estos eventos durante el ensamble de las partículas virales.
- ✿ Estudiar a detalle si se pudieran estar afectando: la salida, reconocimiento por los receptores o desensamble de la cápside del virus de las partículas que se produzcan en ausencia de las chaperonas.
- ✿ Determinar los defectos estructurales que tienen las partículas virales aisladas de células en las que se silencien a las chaperonas moleculares. Con la finalidad de correlacionar los cambios en la estructura con la función de las proteínas virales.
- ✿ Se ha visto que las proteínas NSP4, VP4 y VP7 tienen cierta ubicación en la membrana de las partículas virales envueltas, por lo que se propone evaluar si al silenciar a las chaperonas, estas proteínas conservan esta disposición. Esto con la finalidad de evaluar si el mal plegamiento de las proteínas causa un arreglo distinto de estas proteínas desde que se encuentran en la fase de partículas envueltas.
- ✿ Evaluar si rotavirus induce una UPR, si pudiera estar modulando esta respuesta y a qué nivel, con la finalidad de conocer más acerca de las funciones de las proteínas virales y su interacción con la célula.
- ✿ Determinar por qué la ausencia de Grp78 desestabiliza la morfología del RE y con esto proponer una posible nueva función para esta proteína.
- ✿ Determinar si el silenciamiento de Grp78 y calreticulina inducen una UPR, tanto en condiciones normales como al estresar a las células, con la finalidad de proponer nuevos posibles mecanismos en la regulación de esta respuesta.
- ✿ Utilizar a rotavirus como modelo de proteínas que dependen de las chaperonas celulares, para estudiar y determinar la función éstas últimas.

ANEXO I

**Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus
infectious particles**

Liliana Maruri-Avidal, Susana López, and Carlos F. Arias*

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

Running title: Rotavirus assembly requires ER chaperones

Manuscript information:

Abstract: 266 words

Text: 8171 words (excluding references)

Figures: 8

*Corresponding author: Dr. Carlos F. Arias, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca,
Morelos, 62210, México. Phone (52)(777) 311-4701. Fax (52)(777) 317-2388. E-mail:
arias@ibt.unam.mx

Abstract

The final assembly of rotavirus particles takes place in the endoplasmic reticulum (ER). In this work we evaluated by RNA interference the relevance on rotavirus assembly and infectivity of grp78, PDI, grp94, calnexin, calreticulin, and ERp57, members of the two described ER folding systems. Silencing the expression of grp94 and Erp57 had no effect on rotavirus infectivity, while knocking-down the expression of any of the other four chaperons caused a reduction in the yield of infectious virus of about 50%. In grp78-silenced cells the maturation of the oligosaccharide chains of NSP4 was retarded; in cells with reduced levels of calnexin the oxidative folding of VP7 was impaired and the trimming of NSP4 was accelerated, while the formation of disulfide bonds of VP7 was also accelerated in calreticulin-silenced cells. The knock-down of PDI impaired the formation and/or rearrangement of the VP7 disulfide bonds. All these conditions also affected the correct assembly of virus particles, since when compared with virions from control cells, they showed an altered susceptibility to EGTA and heat treatments, a decreased specific infectivity, and a diminished reactivity with MAb M60 to VP7, which only recognizes this protein when its disulfide bonds have been correctly formed. In the case of grp78-silenced cells the virus produced bound less efficiently to MA104 cells. All these results suggest that these chaperones are involved in the quality control of rotavirus morphogenesis. The complexity of the steps of rotavirus assembly that occur in the ER provide a useful model to study the organization and operation of the complex network of chaperones involved in maintaining the quality control of this organelle.

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is a specialized compartment where important functions take place to maintain the cellular homeostasis, including protein translation, folding of newly synthesized proteins, N-linked glycosylation, disulfide bond formation, transport of proteins to their target sites within the cell and to the extra cellular milieu, and sensing and mediating the cell response to stress (57).

Molecular chaperones and folding enzymes are important components of the ER machinery; their principal function consists in maintaining the ER quality control (17) through avoiding the nonspecific interactions among newly synthesized proteins, maintaining them in a proper state to fold, and marking the misfolded proteins for degradation (18, 22, 28, 47, 52). Two folding systems have been proposed to contribute to this quality control (19, 33). One of these is composed by grp78 (also known as BiP), grp94 (also known as endoplasmin), and PDI (protein disulfide isomerase), although other proteins have been isolated in complexes with these chaperones (26, 35). The second system, known as the “calnexin-calreticulin cycle”, is integrated by calnexin, calreticulin, and ERp57 (9, 16, 48).

The first system, known as the “grp78 system”, works by recognizing hydrophobic residues in the target proteins; the binding and release of these proteins is regulated by ATP hydrolysis (24, 27, 30). The second system acts on glycosylated proteins; when a core glycan (Glc3-Man9-GlcNAc2) is added to newly synthesized proteins, two terminal glucoses are removed, and the monoglucosylated proteins are then recognized by the lectin-like proteins calnexin or calreticulin that expose them in turn to ERp57, a thiol-disulfide oxidoreductase (19). Calnexin is a transmembrane protein, while calreticulin has a luminal disposition.

Rotaviruses, the leading cause of severe dehydrating diarrhea in infants and young children worldwide, are nonenveloped viruses formed by three concentric layers of protein that enclose a double-stranded RNA genome. The outermost layer is composed by glycoprotein VP7, which forms the smooth surface of the virus. From this surface, spike-like structures formed by VP4 project (10). In infected cells large cytoplasmic inclusions termed viroplasms are formed, and these are thought to be the sites where double-layered particles (DLPs) assemble. The DLPs then mature by budding from the viroplasm structures into the adjacent ER membrane, modified by viral glycoproteins VP7 and NSP4. During this process, mediated by the interaction of DLPs with NSP4, the particles acquire a transient membrane envelope that contains VP4, NSP4, and VP7 (10, 49), which is later removed to yield the mature triple-layered particles (TLPs). The mechanism of removal of the transient lipid envelope is largely unknown, although VP7 has been reported to be important for this step (32).

VP7 is an integral ER membrane glycoprotein oriented to the luminal side of the ER. It is 326 amino acids long, and is modified in most rotavirus strains by N-glycosylation at asparagine residue 69, and by the establishment of several disulfide bonds that are important for the correct folding of the protein and maturation of viral particles (8, 60). NSP4, a 175 amino acids long nonstructural protein, is modified at its amino terminus by two high mannose N-glycosylation chains (asparagines 8 and 18). The protein spans the membrane only once, with the glycosylated amino-terminal region oriented to the luminal side of the ER and the carboxy-terminal region (amino acids 44 to 175) to the cytoplasmic side (1).

It is known that the correct assembly of infectious virus particles depends on the glycosylation of NSP4, the formation of disulfide bonds in VP7, and the adequate ATP and calcium concentrations in the ER, since drugs such as brefeldin, tunicamycin,

calcium ionophores, and thapsigargin, block the morphogenetic process of the virus and non-infectious enveloped lipid particles accumulate in the lumen of the ER (29, 36, 39, 41, 51). On the other hand, it has been reported that molecular chaperones grp78 and grp94 increase their levels of expression during rotavirus infection, and interact with the viral structural polypeptides VP7 and VP4 (7, 65). In addition, PDI has been reported to interact with the non-glycosylated form of NSP4 and with VP7 (39), and calnexin with NSP4 (38). However, the significance of these interactions on virus assembly has not been determined, and the knowledge about the cellular proteins relevant for the morphogenesis of rotaviruses is still very limited.

In this work we evaluated the relevance on rotavirus assembly of members of the two ER folding systems through silencing their expression by RNA interference (RNAi). We found that grp78, PDI, calnexin, and calreticulin are important for the formation of infectious virus, while grp94 and ERp57 are not. The involved proteins contribute to promote the timely trimming of the carbohydrate chains of VP7 and NSP4, the correct formation of VP7 disulfide bonds, and the incorporation of properly folded VP7 into TLPs.

Materials and Methods

Cells, viruses, and antibodies. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS). Rhesus rotavirus (RRV) was obtained from H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA, and was propagated in MA104 cells as described previously (46). Monoclonal antibody (MAb) M60 was kindly provided by H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA. The rabbit hyperimmune serum to NSP4, C-239, was produced in our laboratory. Polyclonal antibodies to purified RRV TLPs, to NSP5, and to recombinant vimentin, were produced in rabbits as described previously (14). Antibodies to grp94, calnexin, and PDI were acquired from Affinity BioReagents; antibodies to calreticulin, ERp57, and to the ER retention signal KDEL were from Stressgen Biotechnologies. Grp78 was detected with the KDEL antibody. Goat anti-rat immunoglobulin G (IgG) coupled to Alexa 488, goat anti-mouse IgG coupled to either Alexa 488 or 568, and goat anti-rabbit IgG coupled to either Alexa 488 or 568, were from Molecular Probes. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from Perkin-Elmer Life Sciences, and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG was from Zymed.

siRNA transfection. The sequence and relative positions of the small interfering RNAs (siRNAs) evaluated in this work are shown in Table 1; these were purchased from Dharmacon Research (Lafayette, Co.). As a negative control, a previously reported irrelevant siRNA to the green fluorescent protein (GFP) (32) was used. siRNA transfection was carried out in 80% confluent cells monolayers cultured in 48-well plates or in 25 cm² flask that were transfected with 100 μ l or 1000 μ l respectively, of a

mixture containing 60 µg/ml oligofectamine (Invitrogen), and the indicated amount of each siRNA (Table 1), in MEM without serum. The transfection mixture was added to cells previously washed with MEM and incubated for 8 h at 37°C. After this time the transfection mixture was removed, the cells were washed with MEM, and kept in this medium without serum and without antibiotics for 16 h at 37°C; the cells were then washed and kept in MEM supplemented with 2% FBS for 48 h at 37°C. Two to four different siRNAs specific for the grp78, grp94, and calnexin genes were initially designed. After their initial evaluation, the most effective siRNAs were used throughout this work (Table 1). To silence the expression of PDI we used a reported siRNA sequence (59), and for calreticulin and ERp57, siGenome Smartpools from Dharmacon were used.

Infection of cells and titration of viral progeny. Transfected cell monolayers, in 48-well plates or in 25 cm² flasks, were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 3, and then incubated for 12 h at 37°C. At this time, the cells were lysed by two freeze–thaw cycles, and the lysates were treated with 10 µg/ml of trypsin for 30 min at 37°C. The infectious titer of the viral preparations was obtained by an immunoperoxidase focus assay (15, 46). Briefly, confluent MA104 cells in 96-well plates were washed twice with MEM, and serial fold dilutions of the above mentioned viral lysate were adsorbed to the cells for 60 min at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed once with PBS, MEM was added, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. RRV-infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay using a rabbit hyperimmune serum to rotavirus, as described (46). Focus forming units (ffu's) were counted with the help of a Visiolab 1000 station (Biocom, France) as it has been previously reported (15).

Immunoblots. Cells transfected with siRNAs against the molecular chaperones were lysed at 72 h post-transfection with Laemmli sample buffer, and the proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in PBS with 0.2% Tween-20, and incubated at room temperature (RT) with the indicated primary antibodies in PBS containing 0.1 % milk and 0.2% Tween-20, followed by an incubation with secondary, species-specific, horseradish peroxidase-conjugated antibodies. The peroxidase activity was developed by the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences), following the manufacturer's instructions. The intensity of each band was quantified by densitometry, using the Image Pro Plus 5.0 software.

Immunofluorescence. MA104 cells were grown on coverslips and infected as described above. The cells were fixed at the indicated times with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at RT. After this time the cells were washed four times with PBS, and permeabilized by incubation with PBS-1% bovine serum albumin (BSA), 0.5 % Triton X-100, 50 mM NH₄Cl for 15 min at RT. After washing four times during 5 min with 50 mM NH₄Cl in PBS with gentle swirling, the cells were incubated for 1 h at RT with primary antibodies diluted in blocking buffer (50 mM NH₄Cl, 1% BSA in PBS), and then rinsed four times with 50 mM NH₄Cl in PBS. The coverslips were then incubated with the appropriate Alexa-labeled secondary antibodies in 50 mM NH₄Cl in PBS for 1 h at RT. The cells were washed 4 times with PBS, and mounted on glass slides using Fluoprep (BioMérieux). The slides were analyzed and captured with an E600

epifluorescence microscope coupled to DXM1200 digital still camera (Nikon). The images were digitally captured and prepared in Adobe Photoshop 7.0.

Radiolabeling, isolation, and analysis of viral particles. Cells grown in 25 cm² flasks were transfected with the indicated siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. At 5 hpi the cells were incubated with MEM without methionine for 1 h, and then 50 µCi /ml of Easy Tag EXPRESS-[³⁵S] labeling mix (407 MBq) (Perkin Elmer, NEN) was added to the medium, and further incubated for 6 h at 37°C. For the pulse-chase experiments, cells, in 48-well plates were starved from methionine as described above and then labeled with 200 µCi of methionine L-[³⁵S] (185MBq) (Perkin Elmer, NEN) for 5 minutes, starting at 7 hpi. The label was then chased by washing and incubating the cells with MEM containing an excess of methionine (10 mM) and 1mM cycloheximide (Sigma). After the chase period, the cells were incubated with ice-cold PBS containing 40 mM *N*-ethylmaleimide (NEM) (Sigma) for 2 min to prevent artifactual S-S linkages. The cells were then lysed in ice-cold non-denaturing lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 µg of aprotinin and leupeptin per ml, and 20 µg of phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) per ml). Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 x g for 2 min in before use. The viral particles were purified by isopycnic CsCl ultracentrifugation as described previously (46). The opalescent bands corresponding to the different types of particles were collected by puncture, and their protein composition analyzed by SDS-10% PAGE. The radioactivity incorporated into each band was determined by measuring trichloroacetic acid precipitable counts in a scintillation counter. To determine the virus infectivity in each band, CsCl was removed by desalting-centrifugation on Sephadex G-

25, the virus was activated with trypsin, and the infectious titer was determined as described above.

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA). Twenty microliters of radiolabeled lysates, or 40 μ l of purified TLPs desalted and treated or not with 3 mM of EGTA for 10 min at 37°C, were incubated with 2 μ l of MA60 or 5 μ l of the C-239 polyclonal antibody in 80 μ l of RIPA buffer (1% Triton X-100, 1% deoxycolic acid, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 20 μ g PMSF per ml, and 2 μ g aprotinin and leupeptin per ml) during 1 h at RT. The samples were centrifuged at 13,000 g for 5 min, and the supernatants were mixed with protein A-Sepharose 4B (Zymed) (25 μ l) and then incubated for 1 h at RT in a shaker. The protein A-Sepharose coupled to the immune complexes was pelleted at 6,000 x g for 2 min and washed three times with RIPA buffer. The immune complexes were solubilized in 20 μ l of Laemmli sample buffer containing 1% of β -mercaptoethanol, boiled for 3 min, and analyzed by SDS-12.5% PAGE.

Binding assay. MA104 cells grown in 48-well plates were washed twice and incubated with MEM without serum for 30 min at 37°C. After this time, the MEM was removed, and 500 μ l of a solution of 1% of bovine albumin in PBS was added to the cells and incubated for 1 h at 37°C. The cells were then washed with an ice-cold solution of 0.5% bovine serum albumin in PBS and incubated for 1 h at 4°C with purified TLPs diluted in ice-cold MEM. After this time, the cells were washed three times with ice-cold PBS containing 0.5% BSA, and lysed with 50 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% TritonX-100). The cells were frozen and thawed twice, and the amount of virus present in the lysate was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described (67).

Real-time RT-PCR. MA104 cells grown in 48-well plates were transfected with siRNAs, and 72 h post-transfection the cells were lysed with Trizol (Invitrogen) and total RNA was purified according to the manufacturer's instructions. Total RNA was treated with RNA-free DNase (Ambion) to remove the possible contamination of DNA. The level of molecular chaperones mRNAs was determined by one-step real-time RT-PCR, the primers designed for the amplifications are shown in Table 2. Each reaction tube contained 120 ng of total RNA, 12.5 μ l of SYBR Green Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 0.125 μ l of reverse transcriptase (50 U/ μ l) (Applied Biosystems), 0.25 μ l of RNase inhibitor (20 U/ μ l) (Applied Biosystems), and 1 μ l of each primer (2.5 pmol/ μ l) in a total volume of 25 μ l. Amplification was carried out in an ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems), using the following protocol: reverse transcription 48°C for 30 min, reverse transcription inactivation 95°C for 10 min, PCR 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min, dissociation phase 60°C to 95°C for 30 min. The results were normalized to the levels of GAPDH mRNA detected in each RNA sample. The fold decrease was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (31).

Effect of EGTA and heat on virus infectivity. Cesium chloride-purified TLPs were incubated in a PBS solution containing the indicated concentrations of EGTA for 10 min at 37°C, and the virus samples were diluted 10-fold in MEM without serum. To evaluate the effect of heat on virus infectivity, the TLPs were incubated at 37°C or 45°C for the indicated times. After the EGTA and heat treatments, the virus was titrated on MA104 cells monolayers grown on 96-well plates as described above.

Growth and hemagglutination of influenza virus. MA104 cell monolayers grown in 24-well plates were transfected with the siRNAs, and 72 h posttransfection were infected with an MOI of 1 (determined by plaque assay in MDCK cells) of influenza virus, strain

Wisconsin H1N1, for 1 h at 37°C. After this time the cells were washed with PBS twice, and MEM containing 10µg/ml trypsin was added and the infection left to proceed for 48 h. The virus in the supernatant was then recovered and titrated by a hemagglutination assay. Briefly, the virus (25 µl) was serially diluted in PBS containing 0.125% BSA in a 96-well plate, and an equal volume of previously washed human type O erythrocytes in PBS-0.125% BSA was added, and the mixture incubated for 1 h at RT. The plate was then inspected visually for hemagglutination.

Statistical analysis. All statistical evaluations were carried out with a one-way ANOVA test and Tukey as a post-test using the GraphPad Prism 4.0 software.

Results

Luminal ER molecular chaperones change their distribution in cells infected with rotavirus. The last steps of rotavirus assembly occur in the ER, where infectious viral particles are assembled. The intracellular distribution of viral proteins, including the resident ER glycoproteins VP7 and NSP4, has been described before (6, 13, 32), however, the relative localization of ER molecular chaperones in rotavirus-infected cells has not been characterized. To this end, MA104 cells were infected with rotavirus RRV, fixed at 8 hours post-infection (hpi), and immunostained with antibodies to viral proteins VP7, NSP4, or NSP5 (a viroplasmic protein), and to the ER chaperones grp94, PDI, calreticulin, or calnexin (Fig. 1A). The distribution of these chaperones in mock-infected cells had the regular reticular pattern characteristic of ER proteins; however, in cells infected with RRV the distribution of the luminal chaperones PDI, grp94, and calreticulin changed, becoming concentrated around viroplasms, and co-localizing with viral glycoproteins VP7 and NSP4. Calnexin, a transmembrane molecular chaperone, did not change its distribution upon virus infection. The intracellular distribution of grp78 and ERP57 was not characterized due to the lack of appropriate antibodies. (Fig. 1A).

To determine if the change in distribution of the luminal chaperones correlates with the progression of the virus replication cycle, cells were infected and analyzed by immunofluorescence at different times post-infection. The distribution of chaperones grp94, PDI, and calreticulin showed similar dynamics (shown for PDI in Fig. 1B). They showed a typical ER distribution at 4 hpi; however, as the infection proceeded the chaperones began to accumulate next to viroplasms in some cells (see 6 hpi), and this effect became evident in almost all cells by 8 hpi.

Silencing the expression of ER chaperones by RNAi. Given previous data indicating that chaperones grp78, grp94, PDI, and calnexin interact with rotaviral proteins (38, 40, 65), and the change in localization observed in this work for some of these proteins in virus-infected cells, we explored their relevance, as well as that of calreticulin and ERp57, on the morphogenetic process of the virus. For this, the expression of chaperones was silenced by RNAi; two to four different small interfering RNAs (siRNAs) were tested for each gene, and the most effective siRNAs were subsequently used in this work (Table 1).

In these experiments the cells were transfected with the indicated siRNA and 72 h post-transfection the cells were harvested, and the proteins detected either by immunofluorescence or immunoblot, as described in Materials and Methods. The viability of the cells transfected with the different siRNAs was not affected, as compared to control mock-transfected and non transfected cells, as judged by a cytotoxicity assay (live/dead assay; Molecular Probes) (data not shown). By immunofluorescence the level of expression of the chaperones was significantly decreased when the corresponding siRNAs was used, however, a complete absence of the silenced proteins was not observed for any of them, probably due to the long half-life reported for these proteins and/or to a partial knock-down of their expression (data not shown, and refs. 45, 55). In addition, based on these experiments, the transfection efficiency achieved with the siRNAs was found to be around 75 %.

By immunoblot analysis, all siRNAs were found to decrease the accumulated amount of the corresponding protein by 59 to 87%, as compared to cells transfected with an irrelevant siRNA (Fig. 2A). When the siRNA to grp78 was used, the level of this protein was reduced to 28% of control cells, however, under these conditions the level of grp94, PDI, calreticulin, and ERp57 increased 2.2 to 5.2-fold, while the amount

of calnexin did not change. Similarly, in cells transfected with the siRNA to calreticulin, the expression levels of grp94 and PDI proteins increased 3.9- and 2.5-fold, respectively (Fig. 2A). The siRNAs directed to grp94, PDI, calnexin, and Erp57 only altered the expression of the protein to which they were designed. To confirm the effectiveness of the siRNAs, the level of each targeted mRNA was quantified by real time RT-PCR (Fig. 2B), using total cellular RNA obtained 72 h after siRNA transfection. As shown in figure 2B, the levels of the various mRNAs paralleled those observed for the corresponding protein in the immunoblots, the only exception being the two-fold increase of ERp57 mRNA and the lack of change in the mRNA level of PDI when the siRNA to calreticulin was used, which do not correlate with the level of the encoded protein under these conditions (Fig. 2A).

Silencing the expression of chaperones decreases the yield of infectious rotavirus.

To determine whether the knockdown of ER chaperones affects the yield of infectious rotavirus particles, cells were transfected with siRNAs, and 72 hours post-transfection were infected with RRV at an MOI of 3. Fourteen hpi the cells were harvested, and the infectious virus present in the cell lysates was titrated by an immunoperoxidase assay. Silencing the expression of grp94 and ERp57 did not affect the yield of viral progeny as compared to that obtained from control cells transfected with an irrelevant siRNA. On the other hand, the siRNAs to PDI, grp78, calnexin, and calreticulin decreased the yield of viral progeny between 30 and 55% as compared to control cells (Fig. 3). This level of reduction of virus yield seems to be biologically significant since it correlates with the reduction of the chaperone levels described above,

It has been reported that ER molecular chaperones can act as co-receptors for viruses (23, 62). To evaluate the possibility that some of the chaperones studied in this

work could have a role as a receptor for rotavirus, we titrated by an immunoperoxidase focus forming units assay (see Material and Methods) the infectivity of RRV in cells transfected with the different siRNAs. No difference in the titer of the virus was found in cells transfected with any of the siRNAs used in this work (data not shown), indicating that the cell entry of the virus was not affected by silencing the expression of the chaperones, which would rather seem to be required for the morphogenesis of the virus in the ER.

We evaluated the possibility that knocking-down the expression of the molecular chaperones had a general effect on the physiology of the ER, leading to a nonspecific effect on all proteins that transit through this organelle, regardless if they are specifically assisted or not by chaperones. For this, we tested the effect of silencing these proteins on the production of influenza virus, since the proper maturation of influenza hemagglutinin has been shown to depend on the presence of calnexin and calreticulin, but not of grp78 (42). As expected, the yield of influenza virus, as determined by a hemagglutination assay, was not affected when the expression of grp78 was silenced, but it decreased to 50% in cells infected in the presence of the siRNAs to calnexin and calreticulin (data not shown). These results strongly suggest that rotavirus specifically needs the action of these proteins for the correct maturation of the infectious viral progeny.

Silencing gpr78 and calnexin decreases the specific infectivity of rotavirus TLPs and their ability to bind to the cell surface. We decided to further characterize the effect of silencing grp78 and calnexin on the assembly of rotavirus, since, in addition to the observed reduction of infectious viral yield when the corresponding siRNAs were used, it has been reported that these proteins interact with rotavirus polypeptides. (38,

65). Since the knock-down of grp94 had no effect on the yield of virus progeny, it was used as a control in these assays. To determine if the decreased production of infectious viral progeny induced by the siRNAs was due to a reduced or defective assembly of infectious particles in the absence of the chaperones, cells transfected with the siRNAs to grp78, calnexin, grp94, or with an irrelevant siRNA were infected 72 hours post-transfection, and the viral proteins were metabolically labeled with [³⁵S]-methionine and -cysteine for 6 h starting at 6 hpi. The labeled virions were purified by CsCl density centrifugation, and the bands corresponding to DLPs and TLPs were collected and quantified as described in Materials and Methods. Of interest, when the expression of either grp78 or calnexin was knocked-down, even though the total amount of particles assembled (DLPs+TLPs) was similar to that assembled in control cells transfected with either the irrelevant siRNA or the siRNA to grp94, the TLPs to DLPs ratio increased (Fig. 4A), indicating that the assembly of TLPs was more efficient in cells having decreased levels of grp78 or calnexin. However, the TLPs assembled under these conditions had a specific infectivity (ffu's/cpm) about 50% lower than that of TLPs obtained from control cells or cells transfected with the siRNA to grp94, suggesting that despite the fact that TLPs assembled more efficiently in grp78- and calnexin-deficient cells, the structure of these particles was faulty. These TLPs were also found to have a density slightly lower (1.35 g/cm³) than that of the particles isolated from control cells (1.36g/cm³). The viral proteins from DLPs and TLPs purified from the various conditions were found to be present in apparently the same stoichiometric ratios by SDS-PAGE (data not shown).

To determine if the decreased specific infectivity was due to a defect in cell binding, purified TLPs were incubated with a monolayer of MA104 cells for 1 h at 4°C, and the bound virus was detected by an ELISA assay (Fig. 4C). The TLPs produced in

cells transfected with the siRNA to grp78 bound to the cell surface with an efficiency of about 60% that of control TLPs, whereas the binding of the TLPs isolated from cells in which grp94 or calnexin were silenced was not significantly affected. These results suggest that the TLPs isolated from cells transfected with the siRNA to grp78 have conformational changes that prevent them from binding efficiently to the cell surface, and thus from infecting the host cell, while those isolated from cells in which calnexin was knocked-down had a defect posterior to cell binding.

The viral particles assembled in cells with low levels of grp78 or calnexin have an altered conformation. To evaluate potential conformational changes in virions assembled in reduced levels of grp78 or calnexin, purified TLPs were incubated with increasing concentrations of EGTA for 10 min at 37°C, a treatment known to release the outer protein layer of the virus when the calcium concentration is below a threshold that is variable for different rotavirus strains (8, 54). The infectivity of TLPs isolated from cells treated with siRNAs to either grp78 or calnexin was significantly more sensitive to low concentrations of EGTA (0.025 and 0.05 mM) than that of TLPs purified from cells transfected with the siRNA to grp94 or the irrelevant siRNA (Fig. 5A).

The stability of the virus infectivity was also tested by incubation of the virions at 45°C for various periods of time. The infectivity of TLPs purified from grp78-deficient cells was more sensitive in all conditions tested than that of control TLPs or TLPs isolated from cells transfected with the siRNA to grp94. On the other hand, the infectivity of TLPs from calnexin-deficient cells was significantly more stable than that of all other TLPs (Fig. 5B). Altogether, these results suggest that the surface proteins of TLPs purified from grp78- and calnexin-silenced cells have structural differences with respect to TLPs transfected with the irrelevant siRNA or the siRNA to grp94. These

conformational differences are most probably slight, since they could not be clearly evidenced by treatment of the purified virus particles with different proteases and SDS-PAGE analysis (data not shown).

Processing of the viral glycoproteins is altered in grp78-, calnexin-, and calreticulin-silenced cells. To analyze if the posttranslational maturation of VP7 and NSP4 were altered in cells with low levels of grp78, calnexin, grp94, or calreticulin, the expression of these proteins was silenced, and the processing of the viral glycoproteins was determined by pulse-chase experiments and SDS-PAGE analysis. Cells were transfected with the corresponding siRNA and 72 h later were infected with RRV at an MOI of 3. At 8 hpi the cells were metabolically labeled with [³⁵S]-methionine for 5 min, and then chased for the indicated periods of time. The viral proteins were immunoprecipitated with MAb M60 to VP7 or with polyclonal antibody C-239 to NSP4, and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions (Figs. 6 and 7). These proteins were also analyzed by PAGE under nonreducing conditions (see below).

In grp78-silenced cells the oligosaccharide processing of VP7 was not altered, while the processing of the high-mannose carbohydrate chains of NSP4 was retarded, showing a decreased mobility during the early times of chase (up to 30 min); it then reached a full processed state 1 or 2 h later (Fig. 6A). Of interest, in cells where the expression of calnexin had been silenced, the amount of immunoprecipitated VP7 was diminished at all chase times (Fig. 6A). It is known that MAb M60 only recognizes VP7 when its disulfide bonds have been correctly formed (40, 60), raising the possibility that in low levels of this chaperone the viral protein was not being properly folded. To rule out the possibility that the low amounts of immunoprecipitated VP7 were the result of the protein being degraded under these conditions, the VP7 protein present in the total

cell lysate and the immunoprecipitated fractions were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 6B), and quantified by densitometry (Fig. 6C). While the relative amount of VP7 in the cell lysate of calnexin-deficient cells was the same as that found in control cells, the MAb M60-immunoprecipitated fraction was consistently lower at all chase time points (Figs. 6B and C), suggesting that in cells containing reduced amounts of calnexin the disulfide bonds of VP7 are not properly formed, at least up to 2 h of chase. On the other hand, in calnexin-deficient cells NSP4 seems to be processed faster, since immediately after the 5-min pulse (chase time 0) the presence of a faster migrating form of NSP4 was evident (indicated with a dot in Fig. 6A). Above this band a less-defined form of NSP4 was also appreciated (indicated with a star in Fig. 6A), which probably represent unprocessed and/or partially processed forms of NSP4. This less-defined NSP4 band was also detected at chase time 0 in cells transfected with either the irrelevant siRNA or the siRNA to grp94. In calnexin-silenced cells all of NSP4 seems to be in its final processed form (Man₈GlcNAc₂, ref. 10) at 5 min of chase, while this was not apparent in control- and grp94-transfected cells until 10 min of chase. The rapid processing of NSP4 in calnexin-depleted cells suggests that glucosidases I and II act very fast on the protein, which is then modified to its final form by mannosidase I (19).

In cells transfected with the siRNA to calreticulin the mobility of VP7 was not affected, however the amount of VP7 immunoprecipitated by MAb M60 was higher (already after 5 min of chase) as compared to cells transfected with the siRNA control, suggesting that under these conditions the disulfide bonds of VP7 form faster (Figs. 7A and B). The gel migration of NSP4 (i.e., the processing of the protein oligosaccharides) was not affected in calreticulin-deficient cells (not shown).

PDI but not ERp57 participate in the formation of VP7 disulfide bonds. Since calnexin has not been reported to have a direct role in the formation of protein disulfide bonds, we tested the involvement of protein disulfide isomerases in the oxidative folding of VP7. For this, cells were transfected with siRNAs to ERp57, known to be associated to the calnexin-calreticulin cycle (19), and to PDI, which has been shown to interact with VP7 (39) and has been proposed to participate in the cycle of grp78 (33). Seventy-two hours after siRNA transfection the cells were infected and pulse-labeled for 5 min at 8 hpi, and then chased for the indicated periods of time, and the VP7 protein analyzed by SDS-PAGE after immunoprecipitation with MAb M60. VP7 synthesized in PDI-deficient cells was consistently less efficiently precipitated as compared to ERp57-silenced and control transfected cells (Figs. 7A). The lower amount of immunoprecipitated VP7 in PDI-silenced cells was not due to degradation of the protein, since when total labeled proteins were resolved by SDS-PAGE, the accumulated level of VP7 was very similar in all conditions tested (not shown), while immunoprecipitated VP7 was about 50% that of control-transfected cells (Fig. 7B), indicating that PDI and not ERp57 participates in the formation of the correct disulfide bonds in VP7.

Comparative PAGE analysis under reducing and nonreducing conditions showed no significant difference in the migration of VP7 from infected control cells as compared to cells with a reduced expression of chaperones (data not shown). These results indicate that neither the siRNAs to calnexin nor to PDI prevent the formation of S-S linkages in VP7, since the migration of a VP7 protein having reduced disulfide bonds should have been easily detected as a slower migrating entity by PAGE analysis under nonreducing conditions. It thus seems that knocking-down the expression of

calnexin and PDI rather than blocking the formation of S-S bonds, might prevent the formation of additional or shifted disulphide bonds, that have been suggested to occur posttranslationally in VP7 (40). These additional or shifted S-S linkages seem to make the M60 epitope more available to this antibody (40).

The VP7 protein assembled into virions in cells having reduced levels of chaperones are not correctly structured. Given the previous results, we further characterized the conformation of VP7 assembled into virions produced in cells where the expression of chaperones grp78, calnexin, PDI, and calreticulin was knocked-down. For this, purified TLPs were immunoprecipitated with MAb M60 to VP7, before or after treatment with EGTA, to release the surface viral proteins. In the case of untreated TLPs the VP7 antibody pulled down complete viral particles with good efficiency, as judged by the presence in the immunoprecipitated material of all structural viral proteins (Fig. 8, lane ipp -EGTA, in the irrelevant siRNA panel). When the particles were treated with EGTA, MAb M60 immunoprecipitated mostly VP7 (Fig. 8, lane ipp +EGTA, in the irrelevant siRNA panel), indicating that this protein was disassembled from the particles by calcium chelation.

Untreated TLPs from cells with reduced levels of either of the four chaperones tested were immunoprecipitated to levels significantly lower ($P < 0.001$) than those obtained with TLPs purified from cells transfected with the control, irrelevant siRNA (Fig. 8, lanes ipp -EGTA), indicating that MAb M60 recognized less efficiently the VP7 incorporated into particles obtained from chaperone-deficient cells, probably due to a change in the conformation of the protein. In the case of EGTA-treated TLPs, the efficiency of immunoprecipitation of VP7 released from the particles varied depending on the chaperone silenced (Fig. 8, lanes ipp +EGTA). For TLPs purified from grp78-

deficient cells, the amount of immunoprecipitated VP7 was essentially the same as that immunoprecipitated from control TLPs, suggesting that once the protein is released from the virus particles the epitope recognized by MAb M60 becomes exposed or correctly structured. In the case of virions obtained from calnexin- and PDI-deficient cells, the EGTA-released VP7 was recognized about 50% less efficiently than the protein released from control TLPs, suggesting that disulfide bonds are not correctly established in a fraction of the VP7 molecules incorporated into virus particles, as was also observed for the protein immunoprecipitated from crude lysates of cells transfected with the siRNAs to calnexin and PDI (Figs. 6 and 7). When VP7 was immunoprecipitated from EGTA-treated virions purified from calreticulin-silenced cells, all structural proteins were observed, as in the case of untreated TLPs, suggesting that virus particles containing VP7 produced in the absence or reduced levels of this chaperone are more stable to low levels of calcium than control TLPs, probably as result of an altered conformation of the viral surface glycoprotein.

Discussion

Approximately one-third of all proteins in a eukaryotic cell are translocated into the ER, making the lumen of this organelle a very crowded compartment (26). Nevertheless, it has been shown that the ER environment is highly dynamic, with chaperones being highly mobile *in vivo* (58). In agreement with these observations, we found that the luminal proteins grp94, PDI, and calreticulin changed their distribution upon rotavirus cell infection, with a fraction of them concentrating around viroplasms, and colocalizing with viral glycoproteins NSP4 and VP7. The change in distribution of the chaperones is probably the consequence of the accumulation of a large concentration of viral proteins that are in the process of post-translational maturation and incorporation into transient membrane-enveloped virus particles that will later convert into infectious TLPs in the lumen of the ER, suggesting that folding of the viral glycoproteins and probably the assembly of TLPs require the action of ER chaperones.

The potential role of the chaperones in these events was explored by RNAi. When the expression of grp78 was knocked-down, the level of the other chaperones, with exception of calnexin, increased. This was not surprising, since grp78 is known to bind to the luminal domain of the ER transmembrane stress-sensing glycoprotein ATF6, keeping it in an inactive form (56). ATF6 is a factor involved in the activation of transcription of genes containing a mammalian ER stress response element (ERSE), which is present in the genes encoding molecular chaperones grp78, grp94, calreticulin, ERp57, and PDI (66). In grp78-silenced cells containing no or little amount of this protein, ATF6 is probably released from its interaction with this protein, becoming activated and promoting the transcription of the chaperone genes (56). Calnexin is probably not induced under these conditions since its gene does not have an ERSE box (25).

When the expression of calreticulin was knocked-down, the level of grp94 and ERp57 mRNAs increased. Since calreticulin has also been reported to bind ATF6 (21) the mechanism for enhancement of transcription of these chaperones could be similar to that proposed above for grp78. However, an enhancement in the transcription of the grp78 and PDI genes was not observed, suggesting that unknown regulatory mechanisms that induce the expression of folding factors to compensate for the decreased levels of calreticulin may be activated. On the other hand, the level of the PDI and ERp57 foldases did not correlate with the observed levels of their mRNAs under reduced amounts of calreticulin, suggesting a possible post-transcriptional regulation for the synthesis of these proteins.

Grp94 and grp78

Despite the fact that grp94 modifies its intracellular distribution in infected cells (this work), and associates to VP7 and VP4 (65, and data not shown), knocking-down its expression had no effect on viral infectivity. As suggested for its cytoplasmic homologue hsp90 (2), this chaperone could act as a scaffold for proteins forming the complex of the grp78/grp94 system, and may not be essential for their function. On the other hand, the infectious rotavirus progeny decreased when grp78 was knocked-down despite an increased level expression of most of the other molecular chaperones tested, suggesting that grp78 is important either directly or indirectly for the assembly of infectious virus and can not be substituted by any other chaperone.

It has been previously reported that grp78 interacts with VP7 and VP4, but not with NSP4 (65). In contrast, in this work we found that in grp78-silenced cells the electrophoretic mobility of VP7 was not affected in pulse-chase experiments, while the mobility of NSP4 was retarded until 30 min of chase, time after which it reached the

same mobility of NSP4 from control cells. This is the first report, as far as we know, in which the absence of grp78 affects the oligosaccharide trimming of a protein. The delay in processing the NSP4 oligosaccharide chains could be the result of a deficient folding of the protein, which hampers the action of glucosidases, as has been reported for the influenza hemagglutinin (37). This deficient folding could be the consequence of the lack of a direct interaction (not described so far) between grp78 and the viral protein or, alternatively, of a general altered quality control of the ER caused by the deficiency of this chaperone (12, 20, 22).

When TLPs assembled in grp78-deficient cells were compared to TLPs produced in control cells, they were found to have an altered susceptibility to EGTA and heat treatments; to bind less efficiently to MA104 cells; to have a lower specific infectivity and; to be less efficiently immunoprecipitated by MAb M60. All these observations suggest that grp78 is involved in the quality control of TLPs assembly. These results also suggest that although the carbohydrate processing and formation of disulfide bonds of VP7 do not seem to be affected in the absence of grp78, this chaperone is probably required for the correct assembly of VP7 into the viral particles.

VP4 is known to be the virus attachment protein. Thus, the deficient binding of TLPs assembled in grp78-silenced cells could result from a misfolded VP4, since this protein has been reported to interact with grp78 (65), or from an altered conformation of VP4 influenced by its interaction with an incorrectly assembled VP7 (34).

Calnexin and calreticulin

In cells with reduced levels of calnexin the carbohydrate trimming of VP7 does not seem to be affected, although its oxidative folding was impaired, similar to what was observed for influenza virus (42). A direct interaction between VP7 and calnexin has not

been reported, although it could exist and might have not been detected if it were short-lived and/or weak. Alternatively, the ER quality control dependent on the calnexin-calreticulin cycle could be affected, reducing the efficiency of PDI to establish the disulfide bridges of the protein. An affected ER quality control would also be consistent with the fact that TLPs from calnexin-silenced cells have a decreased specific infectivity; have an altered stability to EGTA and heat treatments and; have a diminished reactivity with MAb M60, which was also observed for the VP7 released by EGTA from these particles.

It has been reported that calnexin interacts with the virus nonstructural protein NSP4 (38), and in this work the trimming of NSP4 was found to be accelerated in calnexin-deficient cells. However, the fact that castanospermine (a drug that inhibits the activity of glucosidase I and II) prevents the generation of the monoglucosylated form of the NSP4 glycans and the interaction of the protein with calnexin, while having a limited effect on virus infectivity, has led others to conclude that glucose trimming and calnexin interaction with NSP4 are not critical for virus infectivity (38). The marginal effect observed for castanospermine on virus infectivity could be explained by the fact that calnexin is known to interact with some proteins in a manner independent of monoglucosylated N-linked oligosaccharides (4, 11, 50, 63, 64). Thus, untrimmed NSP4 produced in the presence of this drug could still be bound by calnexin with a weak interaction and for a short period of time, as has been shown for the hepatitis C virus glycoproteins (5).

When the level of calreticulin was decreased, the infectivity of the viral progeny also decreased as compared to control virus. However, in contrast to the delayed formation of disulfide bonds observed in calnexin-deficient cells, in reduced levels of calreticulin the folding of VP7 was found to be accelerated, as has also been reported for

the maturation of the influenza hemagglutinin and the p62/E1 proteins of Semliki Forest virus, as well as for cellular proteins (42). The accelerated folding of VP7 may result from the decreased level of quality control in the ER in the absence of calreticulin. These altered conditions would seem to have an impact not on the proper folding of VP7, as judged by the efficient immunoprecipitation of this protein by MAb M60, but rather in the correct assembly of this protein into virus particles.

PDI and ERp57

The correct formation of disulfide bonds catalyzed by members of the PDI family is frequently the limiting reaction for the proper folding of proteins in the ER (19, 53). In this work, PDI was found to be responsible for formation and/or rearrangement of the disulfide bonds in VP7 that have been proposed to occur posttranslationally (40), while ERp57 does not seem to be involved. In PDI-silenced cells only about 50% of the synthesized VP7 molecules were folded correctly, as judged by their interaction with MAb M60 (Fig. 7), what is comparable to the level of silencing of the PDI expression (Fig. 2). Thus, it would seem that this folding enzyme is limiting, and critical for the formation of the disulfide bonds present in VP7. The marginal 30% reduction in infectivity of TLPs assembled in PDI-deficient cells suggests that not all VP7 molecules assembled into viral particles need to have disulfide bonds for the virus to be infectious. The fact that the disulfide bridges of VP7 are correctly formed in grp78-deficient cells indicate that even though grp78 and PDI have been reported to function in the same ER folding system, the interaction of grp78 with VP7 is not necessary for the formation of its disulfide bonds by PDI.

ER molecular chaperones and rotavirus morphogenesis

It has been shown that VP7 assembles efficiently and functionally into DLPs *in vitro*, with no requirement for chaperones, while the assembly of VP4 is relatively inefficient, although sufficient to produce infectious virus. The order of addition of the two proteins was critical to reconstitute infectious virus particles, where VP4 needs to be added before VP7 (61). In contrast to the low requirements for the assembly of infectious TLPs *in vitro*, we found in this work that multiple chaperones and a foldase enzyme are involved in the assembly of rotavirus TLPs *in vivo*. The complex pathway of rotavirus morphogenesis *in vivo* might reflect the need for an optimized and ordered assembly process of VP4 and VP7 into DLPs. If *in vivo* the assembly of the surface viral proteins needs to follow the same order found *in vitro*, sequestration of VP7 into the ER would allow the initial incorporation of the virus spike protein VP4 into DLPs, what is thought to occur in the cytoplasm (13), followed by the assembly of VP7 in the lumen of the ER.

Members of the two folding systems proposed to function in the ER (19,33) appear to be required for the assembly of rotavirus TLPs. These observations are in agreement with previous findings that indicate that the calnexin-calreticulin and grp78 chaperone systems may act sequentially on protein targets (3, 43, 44). This is not surprising in the case of rotavirus, given the complex steps of virus assembly that take place in the lumen of the ER, involving at least three viral proteins (NSP4, VP7, and VP4). Further experiments are needed, however, to determine the direct interactions that exist between chaperones and viral proteins.

Given the complexity of the steps of rotavirus morphogenesis that occur in the ER, characterization of the assembly of infectious rotavirus represents a challenging, but valuable model to increase our knowledge on the organization and operation of the

complex network of chaperones and enzymes involved in maintaining the quality control of this organelle and the cellular homeostasis.

Acknowledgments

We are grateful to Paul Gaytan and Eugenio López for their support with the synthesis of oligonucleotides. This work was partially supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute. L.M. is a recipient of a scholarship from the National Council of Science and Technology-Mexico and DGEP/UNAM.

References

1. **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**:1695-1703.
2. **Buchner, J.** 1999. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**:136-141.
3. **Cabral, C. M., Y. Liu, K. W. Moremen, and R. N. Sifers.** 2002. Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. *Mol. Biol. Cell* **13**:2639-2650.
4. **Cannon, K. S., D. N. Hebert, and A. Helenius.** 1996. Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin. *J. Biol. Chem.* **271**:14280-14284.
5. **Choukhi, A., S. Ung, C. Wychowski, and J. Dubuisson.** 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* **72**:3851-3858.
6. **Cuadras, M. A., B. B. Bordier, J. L. Zambrano, J. E. Ludert, and H. B. Greenberg.** 2006. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J. Virol.* **80**:3935-3946.

7. **Cuadras, M. A., D. A. Feigelstock, S. An, and H. B. Greenberg.** 2002. Gene expression pattern in Caco-2 cells following rotavirus infection. *J. Virol.* **76**:4467-4482.
8. **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**:828-832.
9. **Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius.** 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**:1882-1888.
10. **Estes, M. K.** 2001. Rotaviruses and their replication, p. 1747-1785. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
11. **Gaudin, Y.** 1997. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J. Virol.* **71**:3742-3750.
12. **Gething, M. J., K. McCammon, and J. Sambrook.** 1986. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell* **46**:939-950.
13. **Gonzalez, R. A., R. Espinosa, P. Romero, S. López, and C. F. Arias.** 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* **145**:1963-1973.
14. **Gonzalez, R. A., M. A. Torres-Vega, S. López, and C. F. Arias.** 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* **143**:981-996.

15. **Guerrero, C. A., S. Zárate, G. Corkidi, S. López, and C. F. Arias.** 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362-9371.
16. **Hammond, C. and A. Helenius.** 1993. A chaperone with a sweet tooth. *Curr. Biol.* **3**:884-886.
17. **Hammond, C. and A. Helenius.** 1994. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **126**:41-52.
18. **Hammond, C. and A. Helenius.** 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:523-529.
19. **Helenius, A. and M. Aebi.** 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:1019-1049.
20. **Hendershot, L., D. Bole, G. Kohler, and J. F. Kearney.** 1987. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J. Cell Biol.* **104**:761-767.
21. **Hong, M., S. Luo, P. Baumeister, J. M. Huang, R. K. Gogia, M. Li, and A. S. Lee.** 2004. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **279**:11354-11363.
22. **Hurtley, S. M., D. G. Bole, H. Hoover-Litty, A. Helenius, and C. S. Copeland.** 1989. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J. Cell Biol.* **108**:2117-2126.

23. **Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, and D. R. Smith.** 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch. Virol.* **149**:915-927.
24. **Kassenbrock, C. K. and R. B. Kelly.** 1989. Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. *EMBO J.* **8**:1461-1467.
25. **Kaufman, R. J.** 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**:1211-1233.
26. **Kleizen, B. and I. Braakman.** 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:343-349.
27. **Knarr, G., S. Modrow, A. Todd, M. J. Gething, and J. Buchner.** 1999. BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of Bip. *J. Biol. Chem.* **274**:29850-29857.
28. **Leitzgen, K., M. R. Knittler, and I. G. Haas.** 1997. Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding. *J. Biol. Chem.* **272**:3117-3123.
29. **Li, W. W., S. Alexandre, X. Cao, and A. S. Lee.** 1993. Transactivation of the grp78 promoter by Ca²⁺ depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. *J. Biol. Chem.* **268**:12003-12009.

30. **Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos, and M. Zylicz.** 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **88**:2874-2878.
31. **Livak, K. J. and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods **25**:402-408.
32. **López, T., M. Camacho, M. Zayas, R. Najera, R. Sánchez, C. F. Arias, and S. López.** 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. J. Virol. **79**:184-192.
33. **Ma, Y. and L. M. Hendershot.** 2004. ER chaperone functions during normal and stress conditions. J. Chem. Neuroanat. **28**:51-65.
34. **Méndez, E., C. F. Arias, and S. López.** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. J. Virol. **70**:1218-1222.
35. **Meunier, L., Y. K. Usherwood, K. T. Chung, and L. M. Hendershot.** 2002. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. Mol. Biol. Cell **13**:4456-4469.
36. **Michelangeli, F., F. Liprandi, M. E. Chemello, M. Ciarlet, and M. C. Ruiz.** 1995. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. J. Virol. **69**:3838-3847.

37. **Mir-Shekari, S. Y., D. A. Ashford, D. J. Harvey, R. A. Dwek, and I. T. Schulze.** 1997. The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells. A site-specific study. *J. Biol. Chem.* **272**:4027-4036.
38. **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**:8705-8709.
39. **Mirazimi, A. and L. Svensson.** 1998. Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7. *J. Virol.* **72**:3887-3892.
40. **Mirazimi, A. and L. Svensson.** 2000. ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J. Virol.* **74**:8048-8052.
41. **Mirazimi, A., C. H. von Bonsdorff, and L. Svensson.** 1996. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology* **217**:554-563.
42. **Molinari, M., K. K. Eriksson, V. Calanca, C. Galli, P. Cresswell, M. Michalak, and A. Helenius.** 2004. Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol. Cell* **13**:125-135.
43. **Molinari, M., C. Galli, V. Piccaluga, M. Pieren, and P. Paganetti.** 2002. Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J. Cell Biol.* **158**:247-257.
44. **Molinari, M. and R. Sitia.** 2005. The secretory capacity of a cell depends on the efficiency of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **300**:1-15.

45. **Ohba, H., T. Harano, and T. Omura.** 1981. Biosynthesis and turnover of a microsomal protein disulfide isomerase in rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **89**:901-907.
46. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. López.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190-200.
47. **Pelham, H. R.** 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:1-23.
48. **Peterson, J. R., A. Ora, P. N. Van, and A. Helenius.** 1995. Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell* **6**:1173-1184.
49. **Poruchynsky, M. S. and P. H. Atkinson.** 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.* **65**:4720-4727.
50. **Rajagopalan, S. and M. B. Brenner.** 1994. Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* **180**:407-412.
51. **Resendez E Jr, J. W. Attenello, A. Grafsky, C. S. Chang, and A. S. Lee.** 1985. Calcium ionophore A23187 induces expression of glucose-regulated genes and their heterologous fusion genes. *Mol. Cell Biol.* **5**:1212-1219.
52. **Rothman, J. E.** 1989. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* **59**:591-601.

53. **Ruddock, L. W. and M. Molinari.** 2006. N-glycan processing in ER quality control. *J. Cell Sci.* **119**:4373-4380.
54. **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**:4877-4883.
55. **Satoh, M., A. Nakai, Y. Sokawa, K. Hirayoshi, and K. Nagata.** 1993. Modulation of the phosphorylation of glucose-regulated protein, GRP78, by transformation and inhibition of glycosylation. *Exp. Cell Res.* **205**:76-83.
56. **Shen, J., X. Chen, L. Hendershot, and R. Prywes.** 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* **3**:99-111.
57. **Sitia, R. and I. Braakman.** 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* **426**:891-894.
58. **Snapp, E. L., A. Sharma, J. Lippincott-Schwartz, and R. S. Hegde.** 2006. Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:6536-6541.
59. **Sullivan, D. C., L. Huminiecki, J. W. Moore, J. J. Boyle, R. Poulson, D. Creamer, J. Barker, and R. Bicknell.** 2003. EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *J. Biol. Chem.* **278**:47079-47088.

60. **Svensson, L., P. R. Dormitzer, C. H. von Bonsdorff, L. Maunula, and H. B. Greenberg.** 1994. Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J. Virol.* **68**:5204-5215.
61. **Trask, S. D. and P. R. Dormitzer.** 2006. Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J. Virol.* **80**:11293-11304.
62. **Triantafilou, K., D. Fradelizi, K. Wilson, and M. Triantafilou.** 2002. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J. Virol.* **76**:633-643.
63. **van Leeuwen, J. E. and K. P. Kearse.** 1996. Calnexin associates exclusively with individual CD3 delta and T cell antigen receptor (TCR) alpha proteins containing incompletely trimmed glycans that are not assembled into multisubunit TCR complexes. *J. Biol. Chem.* **271**:9660-9665.
64. **Ware, F. E., A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrman, and D. B. Williams.** 1995. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**:4697-4704.
65. **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**:9865-9872.
66. **Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori.** 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for

transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**:33741-33749.

67. **Zárate, S., R. Espinosa, P. Romero, C. A. Guerrero, C. F. Arias, and S. López.** 2000. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* **278**:50-54.

Figure Legends

Figure 1. The luminal molecular chaperones change their distribution in rotavirus infected cells. A) MA104 cells grown in 10 mm coverslips were infected or mock-infected with rotavirus strain RRV at an MOI of 3, fixed at 8 hpi, and stained with the following antibodies: rat MAb to grp94; mouse MAbs to calnexin (Cnx), calreticulin (Crt), or PDI; rabbit hyperimmune sera to NSP4 (C-239), NSP5 (C6); and MAb M60 to VP7, followed by the corresponding secondary antibodies: goat anti-rat coupled to alexa-488; goat anti-mouse IgG coupled to alexa-568; or goat anti-rabbit IgG coupled to alexa-488. B) Cells were grown as described above, infected with RRV at an MOI of 3, and then fixed at different times post-infection (4 h, 6 h, and 8 h) and stained with a MAb to PDI, and rabbit hyperimmune sera to NSP4 or NSP5 as primary antibodies, followed by the secondary antibodies goat anti-mouse IgG coupled to alexa-488, and goat anti-rabbit IgG coupled to alexa-568.

Figure 2. siRNAs directed to molecular chaperones decrease the amount of the cognate cellular mRNA and protein. MA104 cells were transfected with siRNAs (Cnx, calnexin; Crt, calreticuline) to the various chaperones as described under Materials and Methods, and the cells were harvested 72 h post-transfection. A) The proteins were resolved by SDS-10% PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and stained with the indicated chaperone antibodies and with an antibody to vimentin. The levels of protein were determined by densitometric analysis of the corresponding bands, and were normalized with the band corresponding to vimentin (the lower band in each panel), which was used as a loading control. Numbers indicate the fold increase or decrease of protein, as related to the value obtained for cells transfected with the irrelevant siRNA control (Irr), which was taken as 1, after normalization with vimentin.

Only the values with a statistically significant difference of $P < 0.01$ are shown. The arithmetic means and standard deviation for at least six independent experiments are shown. B) Total RNA was extracted with Trizol, and the levels of chaperone mRNAs were determined by real-time PCR as indicated under Materials and Methods. The results are expressed as fold-increase or decrease with respect to the value obtained in the cells transfected with the irrelevant, control siRNA, which was taken as 1. The arithmetic means and standard deviation for at least three independent experiments are shown. The values with a statistically significant difference of $P < 0.05$ are shown in bold.

Figure 3. The yield of rotavirus progeny decreases when grp78, PDI, calnexin, and calreticulin are knocked down. MA104 cells were transfected with the indicated siRNA (Cnx, calnexin; Crt, calreticuline) and 72h post-transfection the cells were infected with rotavirus RRV at an MOI of 3. Twelve hpi the cells were harvested, and the infectious progeny virus produced was determined by an immunoperoxidase assay as described in Materials and Methods. The virus yield is expressed as percentage of the yield obtained from cells transfected with the irrelevant siRNA. One-hundred percent infection equals 3.1×10^7 ffu/ml. The reductions of infectivity showing a statistically significant difference of $P < 0.01 (**)$ or $P < 0.05 (*)$ are indicated. The arithmetic means and standard deviation for seven independent experiments are shown.

Figure 4. Silencing the expression of calnexin and grp78 decreases the specific infectivity of rotavirus TLPs. Cells were transfected with the indicated siRNA (Irr, irrelevant; Cnx, calnexin), and 72 h post-transfection the cells were infected with RRV at an MOI of 3. At 5 hours post-infection the cells were starved for 1 h in methionine-

free medium and then metabolically labeled with 50 $\mu\text{Ci/ml}$ of Easy-tag Express [^{35}S] for 6 h. The viral particles were purified by isopycnic centrifugation in CsCl gradients as described in Materials and Methods. A) The amount of [^{35}S] incorporated into virus particles (cpm) was determined by liquid scintillation counting of TCA-precipitable counts. Data are expressed as the percentage of either DLPs or TLPs obtained in cells transfected with siRNAs to grp94, grp78, or calnexin, as compared to the corresponding particles (DLPs or TLPs) purified from cells transfected with the control, irrelevant siRNA. The relative proportions of DLPs vs. TLPs are also shown for the particles obtained from cells transfected with each of the siRNAs employed. B) Specific infectivity of the purified viral particles. The infectivity of the TLPs isolated from cells in which the chaperones were knocked down was titrated by an immunoperoxidase assay, and the focus forming units (ffu's/ml) obtained from this assay were divided by the amount of [^{35}S] (cpm/ml) obtained from the respective purified TLP preparation. The specific infectivity (ffu/cpm) of the viruses is expressed in relative units as compared to that of TLPs obtained from cells transfected with the siRNA control. C) Monolayers of MA104 cells were incubated with different dilutions of purified TLPs for 1 h at 4 °C. The cells were then washed with ice-cold PBS and harvested as described in Materials and Methods. The virus bound to cells was determined by an ELISA. Data are expressed as the percentage of virus bound to the cells with respect to virus obtained from control cells. The arithmetic means and standard deviation for at least three (panels B and C) or four (panel A) independent experiments are shown. The values showing a statistically significant difference of $P < 0.01 (**)$ or $P < 0.05 (*)$ are indicated.

Figure 5. RRV TLPs assembled in cells with reduced amounts of grp78 and calnexin have altered susceptibilities to EGTA and temperature treatments. A)

Purified TLPs were incubated at 37°C for 10 min with the indicated concentrations of EGTA. After a 10-fold dilution in MEM, the viruses were absorbed to cells for 1 h at 37 °C. The infection was allowed to proceed for 14 h at 37 °C and the infectious virus foci were detected by an immunoperoxidase assay as described in Material and Methods. Data are expressed as percentage of the infectivity obtained with mock-treated virus. B) Purified particles were incubated for the indicated times at 45°C. The virus was then absorbed to cells for 1 h at 37°C, and the infection left to proceed as described above. Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained when the virus was pre-incubated for 15 min at 37°C as a control. The arithmetic means and standard deviations for three independent experiments performed in duplicate are shown. The values showing a statistically significant difference of $P < 0.01 (**)$ or $P < 0.05 (*)$ are indicated. SiRNAs: Irr, irrelevant; Cnx, calnexin.

Figure 6. Calnexin and grp78 participate in the folding of viral glycoproteins. Cells were transfected with the indicated siRNAs (Irr, irrelevant; 78, grp78; 94, grp94; Cnx, calnexin), and 72 h later were infected with RRV at an MOI of 3. At 7 hpi the cells were starved for 1 h in methionine-free medium and then metabolically labeled with a pulse of 5 min of ^{35}S -methionine (150 $\mu\text{Ci/ml}$). After the pulse, the cells were chased with Eagle's MEM supplemented with 1 mM cyclohexymide, and 10 mM methionine, for the indicated times. At the end of chase the cells were incubated for 2 min with ice-cold PBS containing 40 mM NEM, and the cells were harvested in lysis buffer. A representative gel of at least four independent experiments is shown in panels A and B. A) Cell lysates were immunoprecipitated either with MAb M60 to VP7 or with polyclonal antibody C-239 to NSP4, and the samples were resolved by SDS-12.5% PAGE and detected by autoradiography. The immunoprecipitated proteins were

detected by autoradiography as described in Materials and Methods. B) Total cell lysates were mixed with sample buffer, boiled, and resolved by SDS-10% PAGE and detected by autoradiography. The lower panel shows the VP7 protein immunoprecipitated with MAb M60 from these samples, as described above. C) Relative amount of total and immunoprecipitated VP7, as determined by densitometry of the autoradiography shown in panel B. The percentage of immunoprecipitated VP7 is normalized for the amount of total protein contained in each sample. The arithmetic means and standard deviations of four independent experiments are shown.

Figure 7. PDI participates in the folding of VP7. Cells were transfected with the indicated siRNAs (Irr, irrelevant; 57, ERp57; Crt, calreticulin), and 72 h later were infected with RRV at an MOI of 3. The cells were then metabolically labeled for 5 min and chased as described in the legend for Figure 6. A representative gel of at least four independent experiments is shown. A) Cell lysates were immunoprecipitated with MAb M60 to VP7, and the samples resolved by SDS-12.5% PAGE and detected by autoradiography. B) Relative amount of immunoprecipitated VP7, as determined by densitometry of the autoradiography shown in panel A. The percentage of immunoprecipitated VP7 in chaperone-deficient cells is normalized to the amount of VP7 immunoprecipitated from cells transfected with the irrelevant siRNA. The arithmetic means and standard deviations of four independent experiments are shown. The values showing a statistically significant difference of $P < 0.05$ (*) are indicated.

Figure 8. The VP7 protein incorporated into TLPs produced in chaperone-silenced cells has an altered immunoreactivity. TLPs produced in cells transfected with the indicated siRNAs (Irr, irrelevant; Cnx, calnexin; Crt; calreticulin) were metabolically

labeled and purified by CsCl density centrifugation as described in Materials and Methods. Purified TLPs, treated or not with EGTA 3 mM for 15 min at 37°C, were immunoprecipitated with MAb M60 to VP7. The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-11% PAGE and detected by autoradiography. Non-immunoprecipitated total (Tot) TLPs, and TLPs immunoprecipitated before (ipp-EGTA) or after (ipp+EGTA) treatment with EGTA are indicated. The amount of TLPs loaded in the gel after immunoprecipitation was four times larger than that of non-immunoprecipitated TLPs. The relative amounts of VP7 and VP6 were determined by densitometry, and normalized to the corresponding VP6 or VP7 proteins present in total non-immunoprecipitated TLPs (lanes labeled as Tot). These results are shown in the two lower panels. The arithmetic means and standard deviations for four independent experiments are shown. The values showing a statistically significant difference of $P < 0.001 (**)$ or $P < 0.01 (*)$ are indicated.

TABLE 1. Sequences and nucleotide positions for the siRNAs employed in this work

RNAi	Concentration (pmol/ml)	Nucleotide positions	Sense sequence	Relative inhibition^a
grp94-1	600	119-139	AAGGAUCAAGGACGGAUGAUG	++
grp94-2*	300	236-256	AAGCCGAAGUUAACAGAAUGA	+++
grp78-1	300	352-372	AAGGUGGUUGAAAAGAAAACU	++
grp78-2*	300	460-480	AAAGAAACCGCUGAGGCUUUAU	+++
grp78-3	300	652-672	AAGAACAUCCUGGUGUUUGAC	-
grp78-4	150	310-330	AAUGACCCGUCUGUGCAGCAG	+
Cnx-1*	600	169-189	AAGGUUACUACAAAGCUCCA	+++
Cnx-2	600	119-139	AAGAGGUAGAAGACUCAAAC	-
PDI ^b	600		AACAACUUUGAAGGGGAGGUC	+++
GFP ^b	300		AACUUACCCUGAAGUUCAUCU	-

^aRelative inhibition of the level of protein compared to cells transfected with an irrelevant (GFP) siRNA. +++, > 70%; ++, 50%; +, < 25%; -, no effect.

*Most effective siRNAs used throughout this work.

^bThe siRNA sequences to PDI and GFP have been previously reported (32, 59). For calreticulin and ERp57, siGenome Smartpools from Dharmacon were used.

TABLE 2. Sequence for primers used for real time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
grp94	TCCGCCTTCCTTGTAGCAGATA	TTGTCGTTCCCCGTCCTAGA
grp78	ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	TGCCGTAGGCTCGTTGATG
Cnx	TCCTTGAAGCAAATGTGTGG	ACTGTCAACGGAGGGTGAAG
PDI	CCGAAGATTTTTGGAGGTGA	TGCTCAGTTTGCCGTCATAG
Crt	CGAGGACTGGGATGAAGAGA	AATCTGGGTTGTCGATCTGC
ERp57	CTGTAAGAACCTGGAGCCCAAGT	TCATTGGCTGTGGCATCCAT
GAPDH	ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT

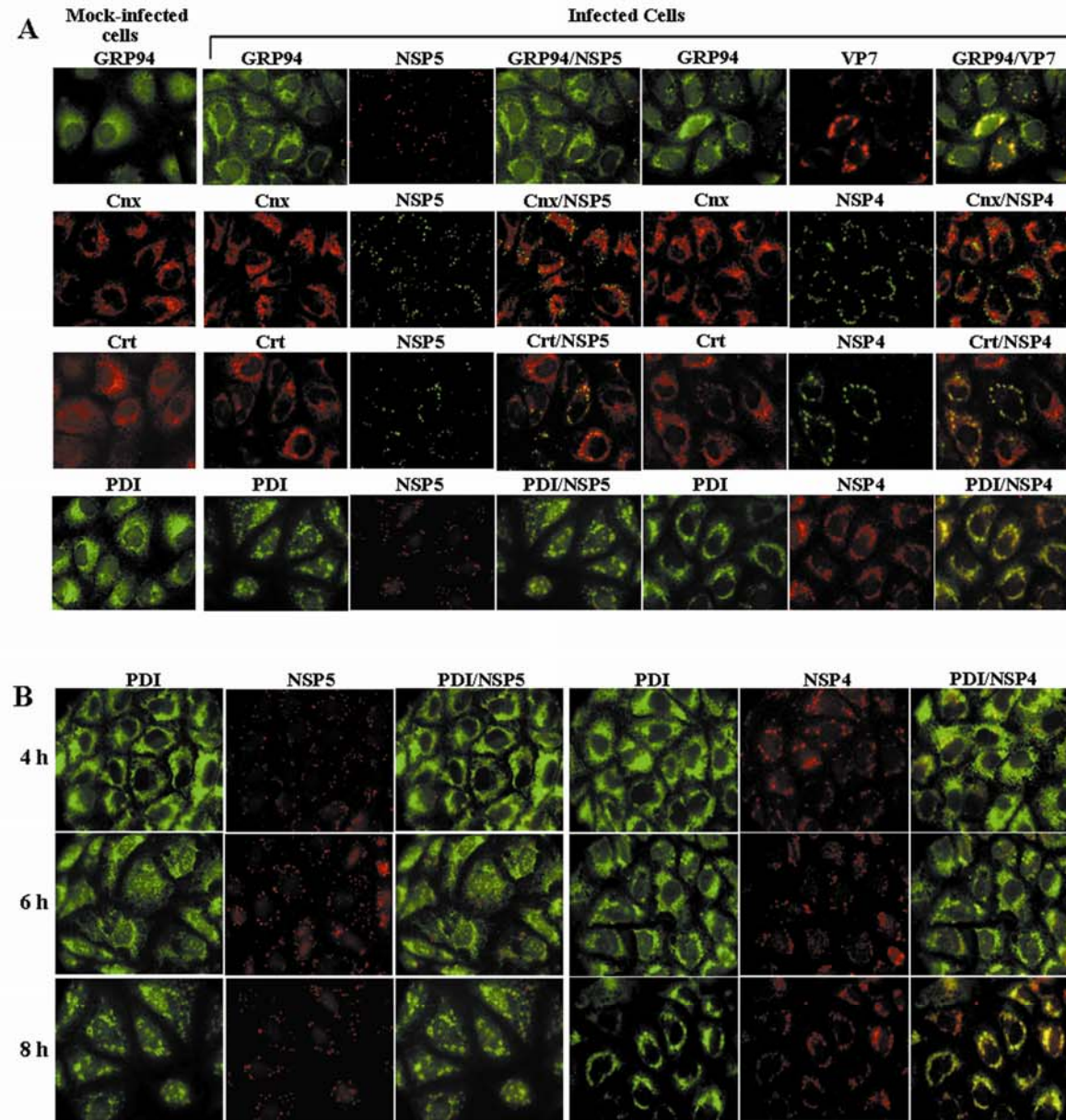


Figure 1

A

		siRNA						
		Irr	grp94	grp78	Cnx	PDI	Crt	ERp57
Antibody to :	grp94		0.13 ± 0.1	5.2 ± 1.1			3.9 ± 0.8	
	grp78			0.28 ± 0.1				
	Cnx				0.37 ± 0.2			
	PDI			2.2 ± 0.5		0.41 ± 0.2	2.5 ± 0.4	
	Crt			3.2 ± 1.2			0.26 ± 0.2	
	ERp57			2.5 ± 0.7				0.35 ± 0.1
	ERp57							

B

		siRNA						
		Irr	grp94	grp78	Cnx	PDI	Crt	ERp57
Level of messenger RNA	grp94	1	0.35 ± 0.2	2.4 ± 0.5	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	2.7 ± 0.45	1.6 ± 0.5
	grp78	1	1.6 ± 0.4	0.3 ± 0.05	1.5 ± 0.5	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.3
	Cnx	1	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.25 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.35	1.3 ± 0.2
	PDI	1	1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.03	1 ± 0.01
	Crt	1	1.7 ± 0.4	3.1 ± 0.5	1 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.35 ± 0.2	1.5 ± 0.3
	ERp57	1	1.2 ± 0.1	2 ± 0.3	1 ± 0.1	1.4 ± 0.4	2 ± 0.3	0.4 ± 0.1
	ERp57	1	1.2 ± 0.1	2 ± 0.3	1 ± 0.1	1.4 ± 0.4	2 ± 0.3	0.4 ± 0.1

Figure 2

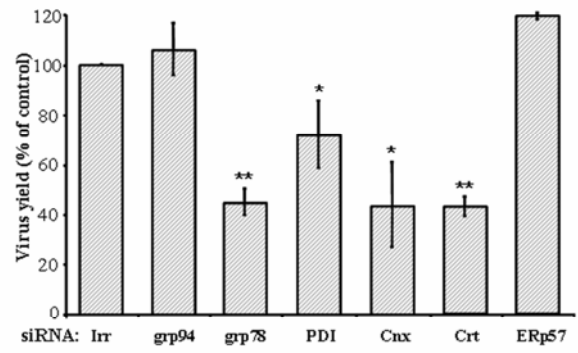


Figure 3

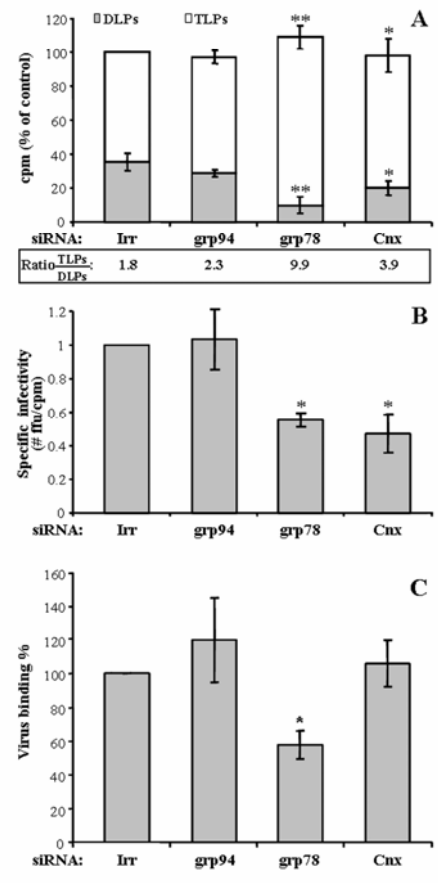


Figure 4

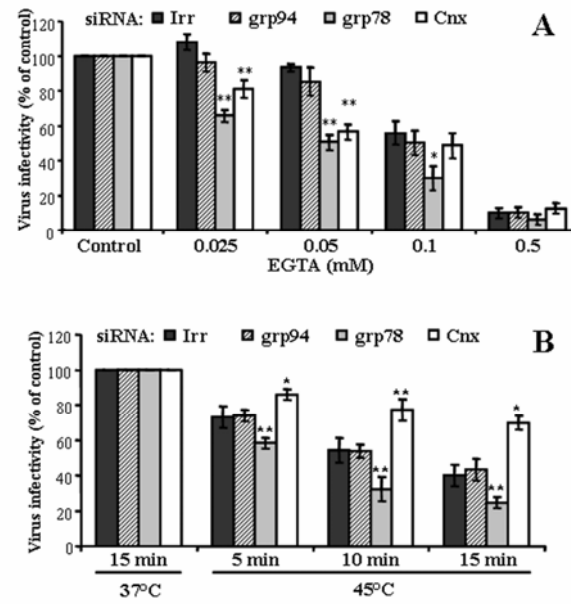


Figure 5

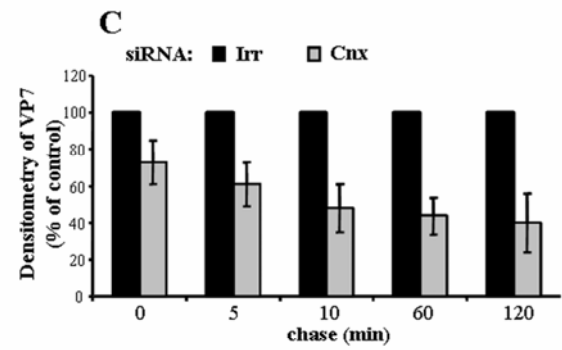
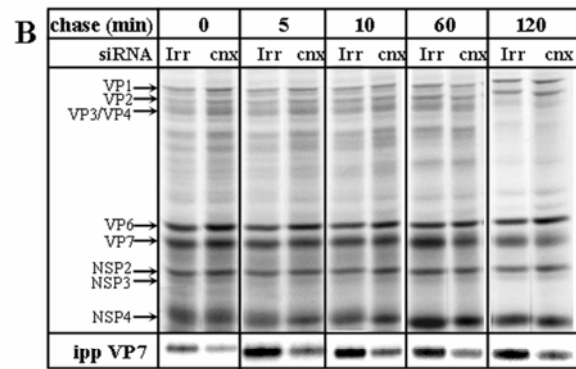
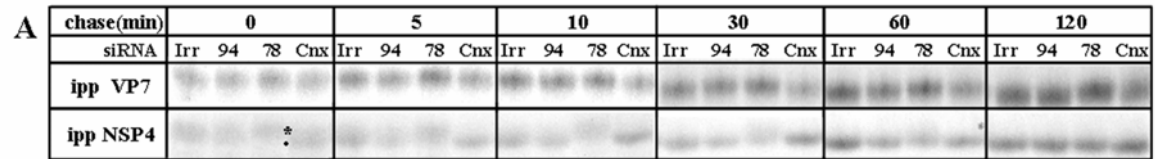


Figure 6

A

chase (min)	0	5	30	120
siRNA	Irr PDI 57 Crt	Irr PDI 57 Crt	Irr PDI 57 Crt	Irr PDI 57 Crt
VP7	[Western blot bands]			

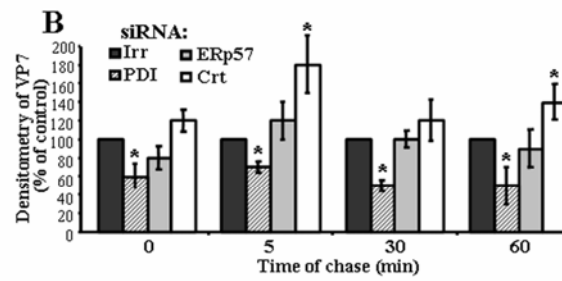


Figure 7

siRNA	Irr		grp78		Cnx		PDI		Crt				
	Tot	ipp	Tot	ipp	Tot	ipp	Tot	ipp	Tot	ipp			
		EGTA		EGTA		EGTA		EGTA					
		-		+		-		+		-	+	-	+
VP2 → VP4 →													
VP6 → VP7 →													
VP7	1	0.92 ±0.2	1	0.08 ±0.04	1	0.4 ±0.2	1	0.6 ±0.2	1	0.04 ±0.004			
VP6	1	0.80 ±0.28	1	0.12 ±0.04	1	0.28 ±0.12	1	0.52 ±0.2	1	0.28 ±0.08			

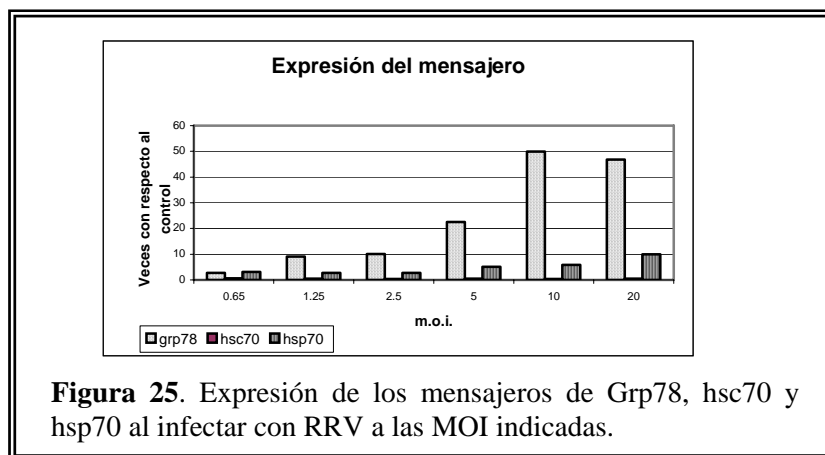
Figure 8

ANEXO II

RESULTADOS ADICIONALES

Nivel del mRNA y proteína de las chaperonas moleculares durante la infección con rotavirus

Para evaluar el nivel del mRNA de las chaperonas moleculares durante la infección con rotavirus se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. Para estandarizar esta técnica, inicialmente se hicieron experimentos para demostrar que las muestras no estuvieran contaminadas por DNA, que los primers fueran específicos (curvas de disociación) e hicimos curvas de rango dinámico con diferentes concentraciones de RNA, para medir la eficiencia de amplificación de cada primer (datos no mostrados). Una vez estandarizada la técnica, los niveles de expresión de RNA mensajero de Grp78, hsc70 y hsp70 se detectaron, partiendo de RNA total extraído de células MA104 infectadas con RRV a diferentes multiplicidades de infección (0.65, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20) (Figura 25). Encontramos que conforme aumenta la multiplicidad de infección, también aumentó la expresión del mensajero de Grp78 y hsp70 y no así para hsc70 que se mantuvo constante. De aquí que en todos los experimentos posteriores utilizamos una MOI de 10, que nos permitió detectar un efecto claramente diferenciable.



Posteriormente se detectaron los niveles de mRNA de Grp78, Grp94, hsp70, hsc70, PDI y Calnexina en células MA104 infectadas con RRV a una MOI de 10 y cosechadas a diferentes tiempos post-infección (0, 1, 3, 6, 9 y 12 h), además en este experimento se incluyeron células sometidas a choque térmico a 47°C por 20 min como control positivo y como control negativo células infectadas con reovirus cosechadas a las 9 hpi. Cabe señalar que el control tiene el valor arbitrario de 1 y corresponde a células que fueron expuestas a un lisado celular sin virus (Tabla 5).

La expresión del mensajero de Grp78 aumenta desde la primera hpi y tiene un aumento hasta de 28 veces con respecto al control a las 9 hpi y disminuye hasta 21 veces a las 12 hpi, por otro lado, con los controles de reovirus y choque térmico no hubo un aumento significativo del mensajero. El mensajero de Grp94 aumenta desde la absorción del virus es decir a las 0 h y tiene un aumento máximo a las 12 hpi de 6.6 veces con respecto al control, además, cuando se infectó con

reovirus también se aumenta la expresión de este mensajero hasta 3.2 veces con respecto al control y con choque térmico no hubo un aumento significativo. El mensajero de hsp70 aumenta desde la primera hpi y alcanza un máximo de 127 veces a las 12 hpi con respecto al control, el choque térmico también causó un aumento importante siendo de 123 veces con respecto al control. Por otro lado, observamos que el mensajero de hsc70 se mantuvo constante en todos los casos. Los mensajeros de PDI y Calnexina no aumentaron significativamente con la infección y los aumentos máximos fueron del orden de 2 veces y de 1.57 veces respectivamente a la primera hpi.

(a) <u>Tratamiento</u> Horas post-infección	Veces de aumento del RNAmensajero con respecto al control					
	Grp78	Grp94	hsp70	hsc70	PDI	Calnexina
0	0.63	1.56	0.61	1.10	0.976	0.97
1	1.85	3.10	1.73	1.43	2.01	1.57
3	2.99	1.87	2.99	1.19	1.56	1.30
6	12.29	3.50	23.73	1.31	1.47	1.08
9	28.15	6.40	68.81	1.90	1.22	1.40
12	21.86	6.60	126.99	1.45	1.48	1.7
Reovirus	1.79	3.23	4.10	1.59		
Choque térmico	2.46	1.92	135.11	2.20		

Tabla 5. Nivel de los mensajeros de Grp78, grp94, hsc70, hsp70, PDI y Calnexina a distintos tiempos post-infección (0, 1, 3, 6, 9 y 12 h) con RRV a una MOI de 10.

Posteriormente, hicimos inmunodetección con membrana, de células tratadas de igual manera que en el caso anterior con la finalidad de detectar el nivel de proteína acumulada a diferentes tiempos post-infección (Tabla 6). Cabe señalar que la cantidad de proteína cargada para cada muestra en los geles fue previamente normalizada haciendo un SDS-PAGE tiñendolo con coomassie y cuantificando algunas bandas al azar por densitometría para ajustar la cantidad de proteína total.

Tratamiento horas post-infección	Nivel de Proteína					
	GRP78	GRP94	HSP70	HSC70	PDI	Calnexina
Control	1	1	1	1	1	1
0 horas	1.35	2.7	1.02	0.94	1.6	1.22
1 hora	1.29	2.52	1.06	1	2.38	4.75
3 horas	2.03	1.79	1.1	1	3.14	12.61
6 horas	1.43	3	0.75	1	4.59	48.61
9 horas	3.19	2.57	0.74	0.93	25.92	61
12 horas	2.8	1.82	0.88	0.67	87.62	216
Reovirus	1.3	1.92	0.9	1.1		
Heat shock	1.2	2.2	3.1	1.29		

Tabla 6. Nivel de proteína. Los valores se obtuvieron midiendo la intensidad de las bandas de los inmunoblots y normalizando con respecto al control interno de carga (vimentina).

Observamos que el nivel de Grp78 aumenta desde la hora de absorción del virus y tiene un pico a las 9 horas post-infección en donde hay 3.19 veces más proteína con respecto al control, no

así para las células que fueron sometidas a choque térmico y las infectadas con reovirus. En el caso de Grp94, ésta tiene un aumento desde la hora de absorción y un máximo de 3 veces de aumento con respecto al control a las 6 horas post-infección y posteriormente empieza a disminuir. Los niveles de hsp70 se mantuvieron más o menos iguales en los diferentes tiempos post-infección, excepto en donde se dio el tratamiento de choque térmico. Los niveles de las proteínas PDI y Calnexina aumentaron significativamente con la infección, teniendo un pico máximo a las 12 hpi de 87 y 216 veces respectivamente. El aumento en el nivel de las proteínas Grp78, Grp94 y hsp70 no fue tan alto como el aumento del mRNA, por lo que pensamos que el RNA de estos genes no se está traduciendo eficientemente en condiciones de infección. Se sabe que durante la infección viral, la proteína no estructural de rotavirus NSP3 compite con la proteína de unión a poli A (PABP) por el factor de inicio de la traducción celular eIF4G (Piron et al. 1998), de tal manera que la síntesis de proteínas celulares se ve abatida con la infección. Para descartar esta posibilidad decidimos silenciar la expresión de NSP3 utilizando un siRNA probado en el laboratorio (Montero et al. 2006b) y las células se cosecharon 9 hpi, y se detectaron los niveles de mRNA y proteína para cada una de las chaperonas moleculares (Tabla 7).

Tratamiento		Nivel de proteína				Nivel de mensajero			
siRNA	Virus	GRP78	GRP94	HSP70	HSC70	Grp78	grp94	hsp70	hsc70
-	-	1	1	1	1	1	1	1	1
Irrelevante	-	0.72	1.02	1.04	0.93	9.62	3.6	1.74	1.47
NSP3	-	1.14	0.95	0.98	0.77	14.55	19.2	3.42	2.06
-	+	0.68	0.83	0.83	0.82	141.69	29.99	64.59	1.8
Irrelevante	+	0.38	0.74	0.9	0.75	35.58	7.7	83.67	1.03
NSP3	+	1.1	0.88	0.89	0.79	1128.35	106.89	80.82	2.08

Tabla 7. Niveles de proteína y mensajero de Grp78, grp94, hsp70 y hsc70, de células interferidas con NSP3, utilizando como control células tratadas con lipofectamina y células tratadas con un interferente irrelevante. Se muestran promedios de 3 experimentos.

Como podemos observar en la tabla, no detectamos un aumento en el nivel de proteína en ninguno de los casos cuando se silenció NSP3, además los niveles de mensajero de Grp78, Grp94 y hsp70 se dispararon mucho más con el interferente de NSP3, lo que parece ser una respuesta a estrés provocada por este interferente, excepto para hsc70 en donde los niveles de mensajero se mantienen constantes. Con estos datos podemos concluir que no es NSP3 la proteína responsable de que no se induzca el nivel de proteína de hsp70, a pesar que el nivel de mensajero de este gen aumentó significativamente. Podemos decir también que el nivel de mensajero y proteína de Grp94 y Grp78 aumentaron con la infección con rotavirus, mientras que los niveles de mensajero y proteína de hsc70 permanecieron constantes en todos los tiempos post-infección. Los niveles de mensajero de calnexina y PDI no aumentaron significativamente con la infección, sin embargo los aumentos en el nivel de proteína fueron notorios.

Por otro lado, se detectaron también los niveles de expresión de RNA mensajero y de proteína de las mismas proteínas de choque térmico en la línea celular Caco 2 (carcinoma de colon humano), que también es utilizada como modelo para estudiar a rotavirus, estas células son polarizadas por lo que se acercan más al modelo in vivo de la forma en que están organizados los enterocitos a los que infecta rotavirus. Al igual que con MA104 se extrajo el RNA total de células Caco2 que fueron infectadas con RRV a una MOI de 10 y fueron cosechadas a diferentes tiempos post-infección. En este caso fueron mas largos los tiempos, ya que en estas células el ciclo replicativo del virus toma más tiempo (Tabla 8).

(a) <u>Tratamiento</u> Horas post-infección	Veces de aumento del RNAmensajero con respecto al células no infectadas			
	Grp78	grp94	hsp70	hsc70
Control	1	1	1	1
3	4.06	1.94	1.21	1.49
6	5.42	1.47	1.68	1.76
12	3.75	4.33	2.13	1.19
24	16.75	2.13	28.31	2.17
48	217.01	0.25	36.23	2.8

Tabla 8. Nivel de mensajero de Grp78, grp94, hsc70 y hsp70 en células CaCo2 a distintos tiempos post-infección, medidos mediante PCR en tiempo real.

Como podemos apreciar en la tabla, la expresión del mensajero de Grp78 incrementó paulatinamente conforme paso el tiempo post-infección, hasta que llego a 48 hpi con un incremento de 217 veces con respecto al control. Los niveles de RNA mensajero de Grp94 tuvieron un pico a las 12 hpi con 4.33 veces de aumento con respecto al control y después disminuyo considerablemente por debajo que los niveles básicos. El mensajero de hsp70 también se incrementa con la infección teniendo un pico a las 48 hpi y hsc70 se mantiene más o menos constante durante la infección.

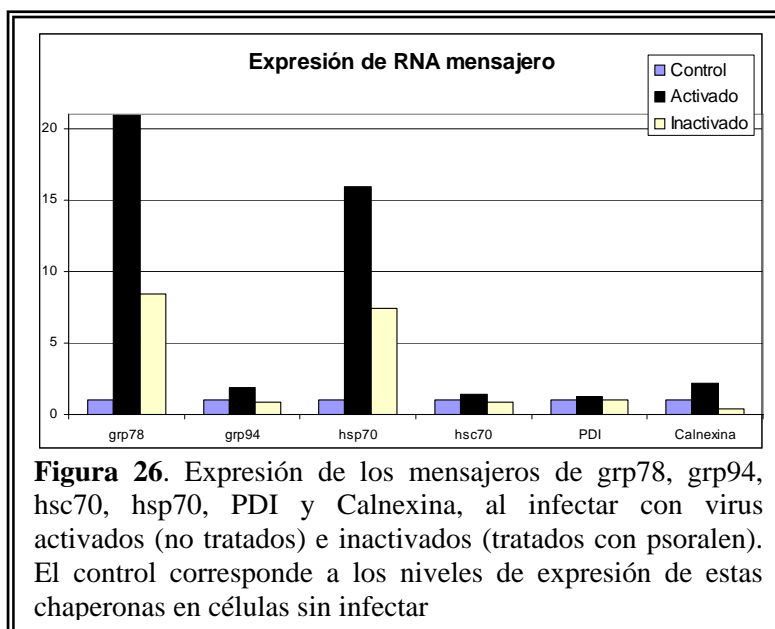
Por otro lado, también se hicieron western blots para analizar los niveles de las proteínas de estrés en células Caco2 (Tabla 9). Encontramos que el nivel de proteína de Grp78 aumentó, teniendo un máximo de 1.34 veces con respecto al control a las 3 hpi, posteriormente disminuyó gradualmente. En el caso de Grp94 no hubo un aumento significativo y sus niveles se mantuvieron más o menos constantes. Los niveles de proteína de hsp70 tuvieron un aumento máximo a las 24 hpi. La proteína hsc70 tuvo un decremento gradual conforme aumento el tiempo de infección, lo cual no paso en células MA104 en las que los niveles de esta proteína se mantuvieron constantes.

En resumen, encontramos que los mensajeros de las chaperonas moleculares evaluadas (Grp78, Grp94, hsp70, PDI y calnexina), aumentaron con la infección con rotavirus en las líneas celulares MA104 y Caco2.

Tratamiento horas post-infección	Niveles de proteína			
	GRP78	GRP94	HSP70	HSC70
Control	1	1	1	1
3 horas	1.34	1.03	1.26	0.7
6 horas	1.23	0.94	1.42	0.61
12 horas	1.14	1.06	1.36	0.62
24 horas	1.07	0.87	1.54	0.62
48 horas	0.7	0.62	1.38	0.57

Tabla 9. Datos de los niveles de proteína de cada una de las chaperonas ya normalizados. Se muestra el promedio de 3 experimentos.

Sin embargo no sabíamos si para que los niveles de estos mensajeros fueran inducidos era necesario que los virus fueran transcripcionalmente activos y que se desencadenara todo el ciclo replicativo o solamente el virus tenía que unirse a las células y entrar para que esta respuesta se diera. Para probar esto inactivamos la infectividad del virus utilizando psoralen, que es un reactivo que cuando se expone a luz ultravioleta se intercala con la doble cadena del virus impidiendo que el genoma viral pueda replicarse. Posteriormente infectamos monocapas de células MA104 con estos virus inactivados y con virus no tratados, y cosechamos a las células a las 9 hpi, para posteriormente extraer el RNA total y cuantificar por PCR en tiempo real el nivel de cada uno de los mensajeros estudiados (Figura 26).



Como podemos observar, en todos los casos en los que utilizamos virus inactivado con psoralen, detectamos un nivel mas bajo de mRNA al compararlo con los niveles a los que se inducen los mensajeros al infectarlos con virus no tratados. De estos resultados concluimos que es necesario que el virus sea transcripcionalmente activo para que aumente el nivel de mensajero de

las chaperonas moleculares, por lo que el mecanismo que activa a la transcripción de estos genes celulares debe de responder o a la replicación o a la síntesis de proteínas virales.

La infección con rotavirus activa y modula una UPR

Se ha reportado que varios virus como reovirus y coronavirus pueden inducir una respuesta a estrés en el RE (UPR) y además modularla (Chan et al. 2006; Smith et al. 2006). Por los resultados que habíamos obtenido, pensamos que era probable que la infección por rotavirus desencadenara una UPR. Para evaluar esta posibilidad, decidimos detectar la inducción de algunos genes de estrés, y observar si se estaban activando con la infección por rotavirus. Lo primero que hicimos fue una cinética de infección con RRV a una MOI de 5 y detectamos la activación de Ire1 midiendo el procesamiento de Xbp1 en condiciones con y sin infección (Figura 27). Para esto se mandó a sintetizar un par de oligos para amplificar el mensajero de Xbp1 (Shang and Lehrman 2004), los cuales detectaron la forma no procesada (424 pb) y la forma procesada (398 pb) de este RNA, entre estas dos formas hay 26 pb de diferencia por un intrón. Si el intron es procesado entonces quiere decir que el efector Ire1 está activado.

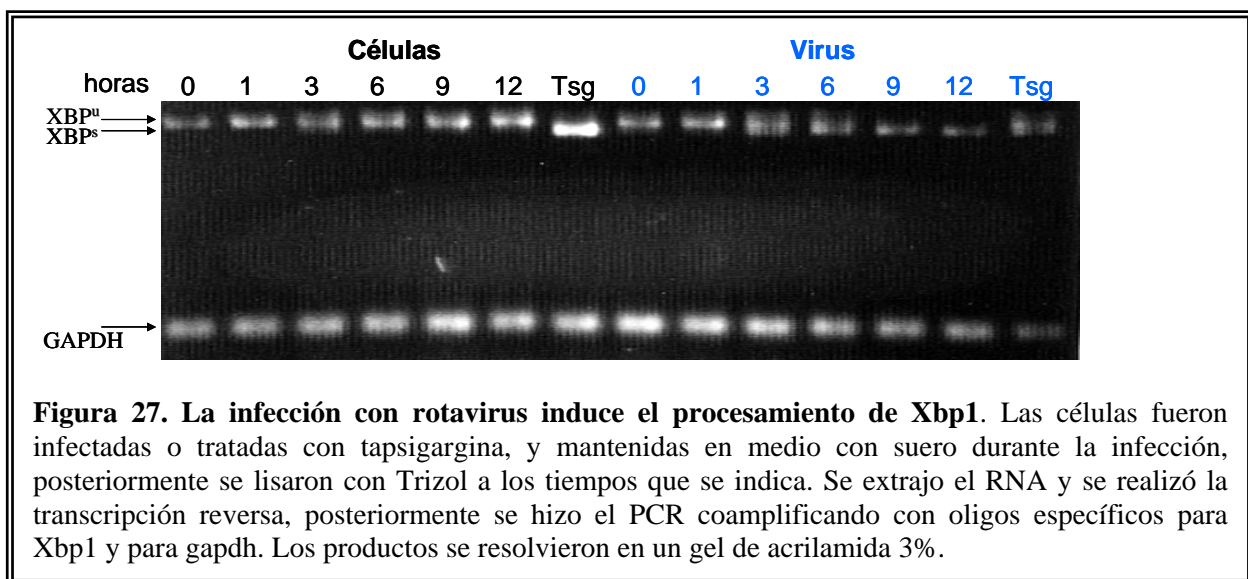
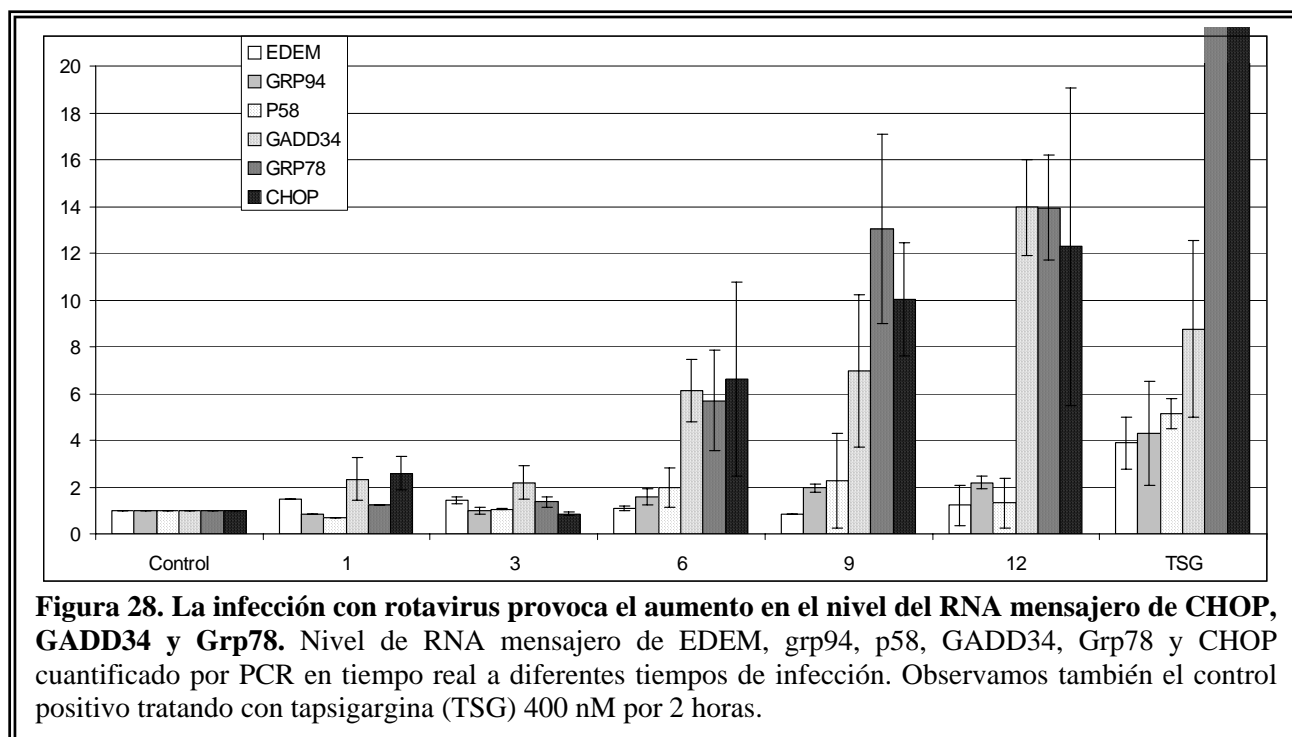
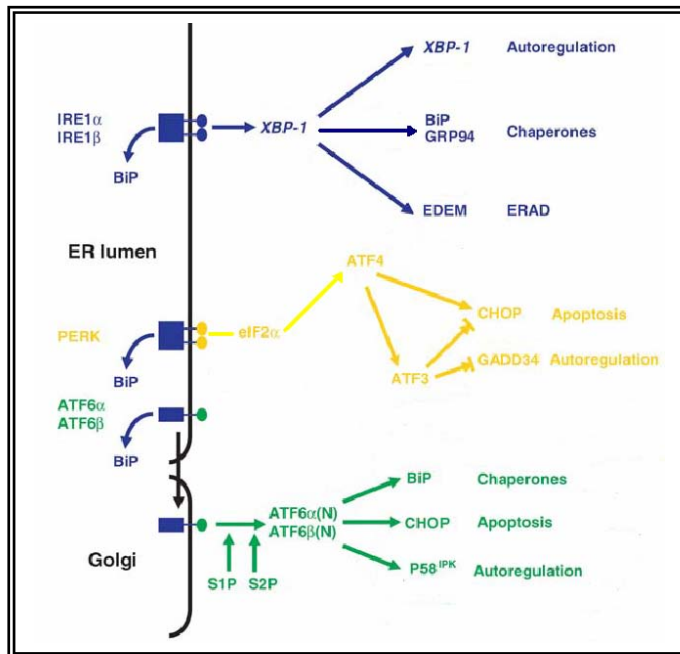


Figura 27. La infección con rotavirus induce el procesamiento de Xbp1. Las células fueron infectadas o tratadas con tpsigargina, y mantenidas en medio con suero durante la infección, posteriormente se lisaron con Trizol a los tiempos que se indica. Se extrajo el RNA y se realizó la transcripción reversa, posteriormente se hizo el PCR coamplificando con oligos específicos para Xbp1 y para gapdh. Los productos se resolvieron en un gel de acrilamida 3%.

Como podemos observar en la figura anterior, en las células no infectadas no se observa el procesamiento de Xbp1, a diferencia de cuando las células fueron tratadas con 2 μ M de Tapsigargina durante 2 h como control positivo. Mientras que la infección con rotavirus induce el procesamiento de Xbp1 desde las 3 hpi. Estos resultados confirman que hay un procesamiento de Xbp1 y por lo tanto una activación de Ire1 al infectar con rotavirus.

Por otro lado, para detectar la activación de los otros dos efectores de la UPR, ATF6 y PERK, lo que hicimos fue una cinética de infección, en la cual infectamos con RRV a una MOI de 5 durante 0, 1, 3, 6, 9 y 12 h y amplificamos los genes de estrés CHOP, GADD34, EDEM y p58. (Figura 28)

Encontramos que el nivel de mRNA de EDEM, Grp94 y p58 no aumentó con la infección. Sin embargo vemos que el nivel de mRNA de CHOP, GADD34 y Grp78 aumentó desde las 6 hpi, teniendo un incremento importante a las 9 y 12 hpi. Estos genes son inducidos por factores transcripcionales que se sintetizan al ser activados los diferentes efectores de UPR, como se muestra en el siguiente esquema.



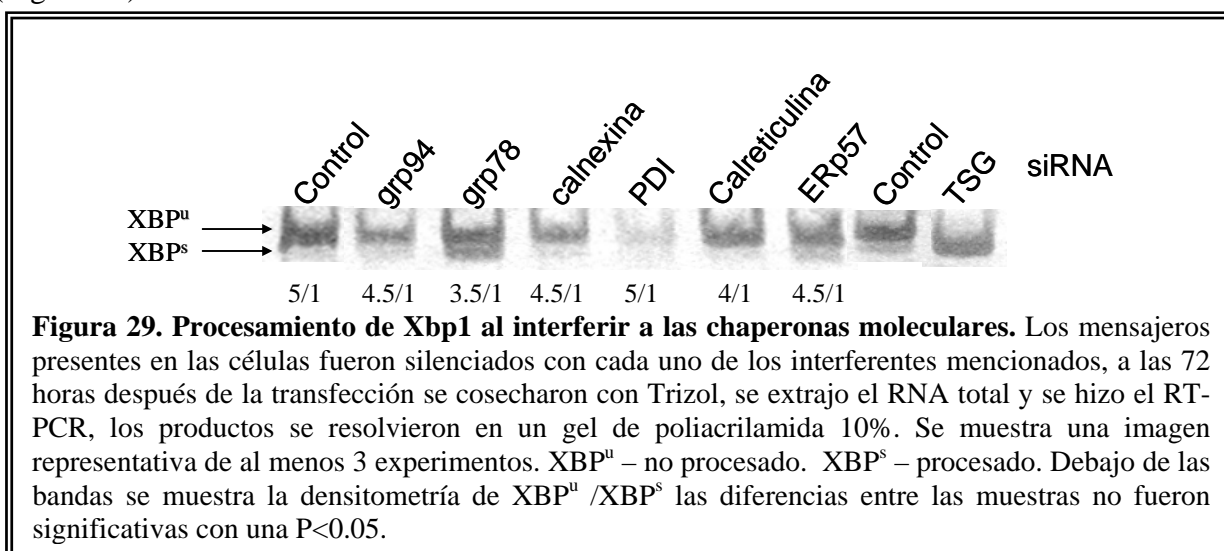
Estos resultados sugieren que la vía de PERK posiblemente esté activada, ya que detectamos la inducción de CHOP. Por otro lado, es muy probable que la vía de Ire1 esté activada, ya que además de detectar el procesamiento de Xbp1 observamos la inducción de Grp78, sin embargo no detectamos la inducción del gen EDEM inducido por esta vía. Por lo que es probable que el virus esté modulando la expresión de estos genes y dado que EDEM es una proteína que tiene que ver

con degradación de proteínas en RE, tal vez no sea favorable para el virus que esta proteína se induzca en la infección. La vía de ATF6 también parece estar activando con la infección, ya que Grp78 y CHOP se inducen, sin embargo el virus podría también estar modulando a los genes de esta vía como a p58 debido a que no se está induciendo la expresión de este mensajero.

Es importante mencionar que aún hacen falta experimentos para determinar si las proteínas de estrés se están traduciendo en células infectadas, qué proteínas virales están induciendo y modulando esta respuesta a estrés, así como determinar en qué le puede ser útil al virus inducir o modular esta respuesta.

Efecto del silenciamiento de las chaperonas sobre la respuesta a estrés de la célula

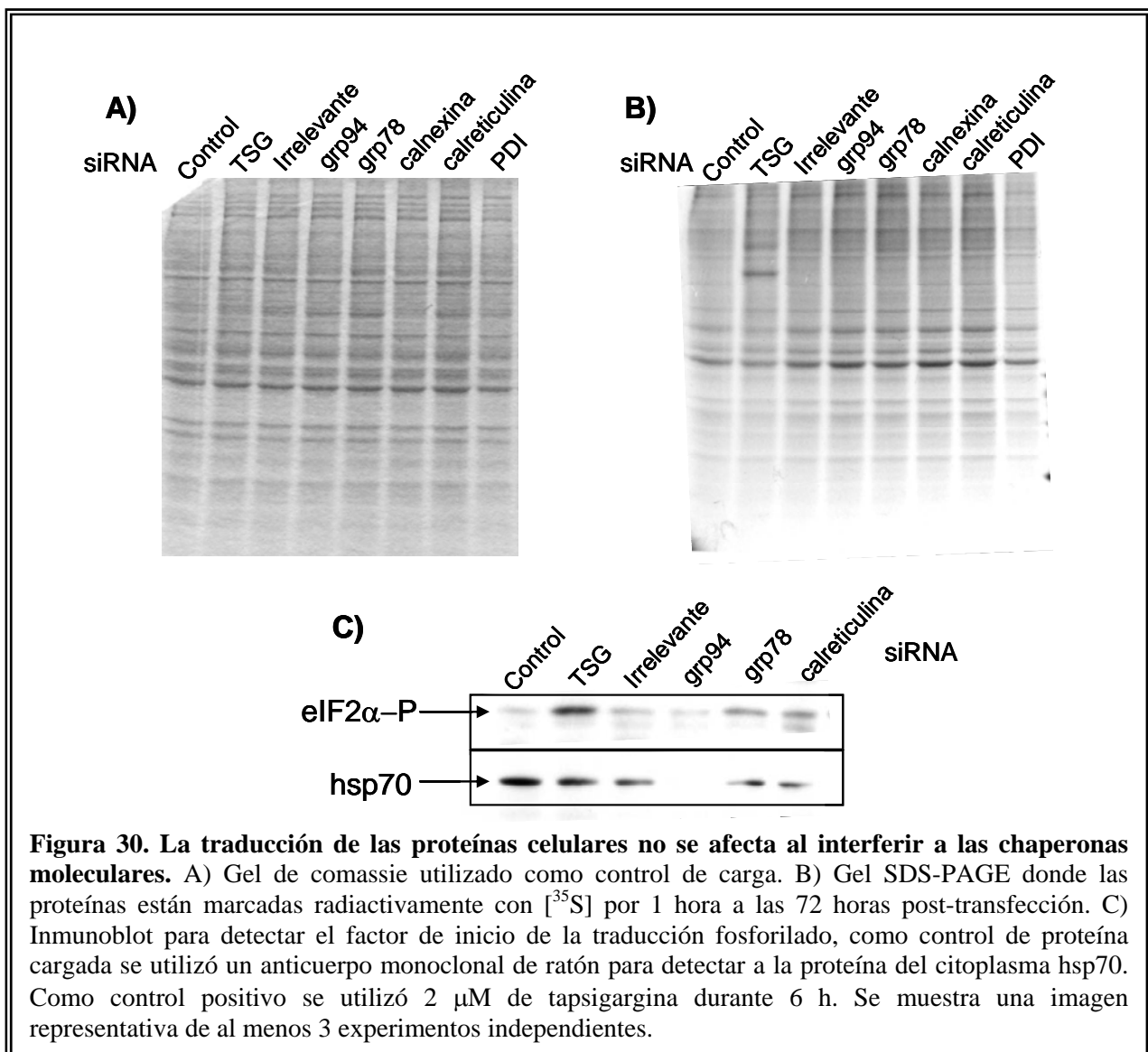
Para estudiar si el silenciamiento de las chaperonas afectaba la UPR, evaluamos algunos genes que se inducen al activarse las proteínas efectoras de la vía de UPR. Para esto detectamos la activación de Ire1, midiendo el procesamiento de Xbp1 en células transfectadas con los siRNAs (Figura 29).



En condiciones control, encontramos que el RNA de Xbp1 no está procesado, al tratar a las células 2 horas con 2µM de Tapsigargina que es un inductor de UPR, notamos la disminución en el tamaño del producto, ya que se da el procesamiento de 26 nucleótidos en el RNA. Cuando silenciamos a las chaperonas moleculares observamos una pequeña cantidad de RNA mensajero de Xbp1 procesado. Al silenciar el gen de Grp78, hubo una mayor cantidad de Xbp1 procesado, sin embargo esto fue efecto de la cantidad del producto de amplificación que cargamos en el gel, por los datos de la densitometría que se observan en la figura 29. Por lo que podemos concluir que al silenciar a las chaperonas moleculares de RE la vía de Ire1 no se activó.

Por otro lado, los efectores PERK y ATF6 podrían haberse activado en ausencia de Grp78. La cinasa PERK se encarga de fosforilar al factor de inicio de la traducción eIF2α y de esta manera se inhibe la traducción de la mayoría de las proteínas celulares. Por lo que decidimos probar si en

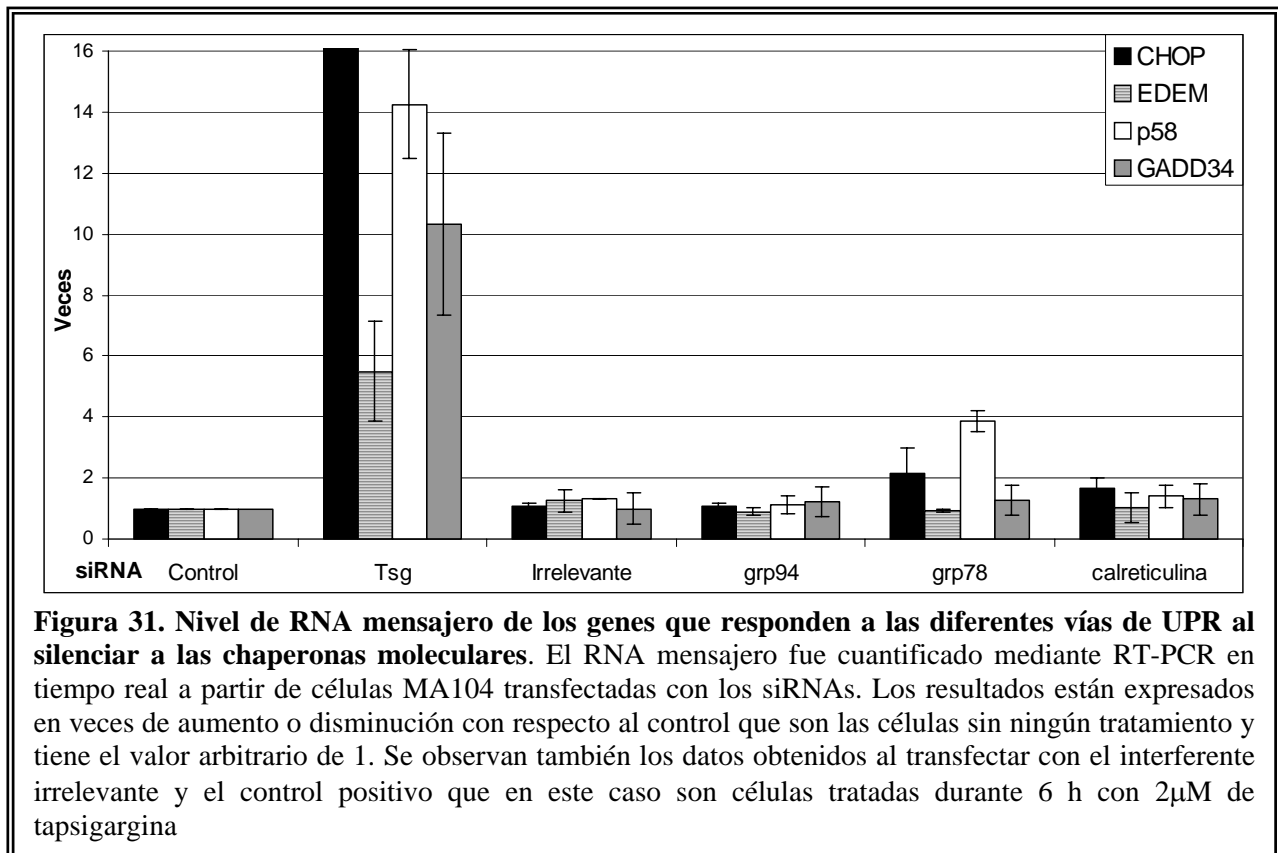
células en donde silenciamos a las chaperonas moleculares, se afectaba la síntesis de proteínas celulares detectándola por marcaje metabólico, además de analizar si el factor de inicio de la traducción eIF2 α estaba fosforilado en estas condiciones (Figura 30).



Como podemos observar en la figura, la traducción de las proteínas celulares no disminuyó significativamente en las células en las que se silenció la expresión de las chaperonas moleculares y tampoco encontramos que el factor del inicio de la traducción eIF2 α estuviera fosforilado, lo que se observa cuando las células fueron tratadas con TSG. Con estos resultados podemos concluir que la vía que induce PERK al activarse, no se induce cuando las chaperonas moleculares están silenciadas.

Por otro lado, sabemos que los efectores de la UPR (ATF6, Ire1 y PERK) promueven la transcripción de genes que codifican para algunas chaperonas moleculares, proteínas involucradas en la degradación, muerte celular, inhibición de la traducción y en general proteínas encargadas de recuperar la homeostasis celular. Por lo que decidimos detectar los niveles de mRNA de algunos de

estos genes para determinar si se inducían cuando silenciábamos la expresión de las chaperonas. El nivel de estos mensajeros fue detectado mediante RT-PCR en tiempo real al silenciar a cada una de las chaperonas moleculares (Figura 31).



Observamos que todos los mensajeros elevan sus niveles de expresión al tratar a las células con TSG, aunque lo hacen a diferentes niveles. Además encontramos que hubo un pequeño aumento de CHOP y de p58 al silenciar a Calreticulina y Grp78 respectivamente, sin embargo este aumento no es significativo al compararlo con los niveles de inducción alcanzados por estos genes al tratarlos con tapsigargina. Los genes de GADD34 y EDEM, no parecen ser inducidos en estas condiciones.

Los resultados anteriores sugieren que al interferir Grp78 y calreticulina se induce la vía de ATF6 y no las otras vías efectoras de la UPR.

La ausencia de Grp78 ocasiona un cambio en la distribución de proteínas celulares y virales

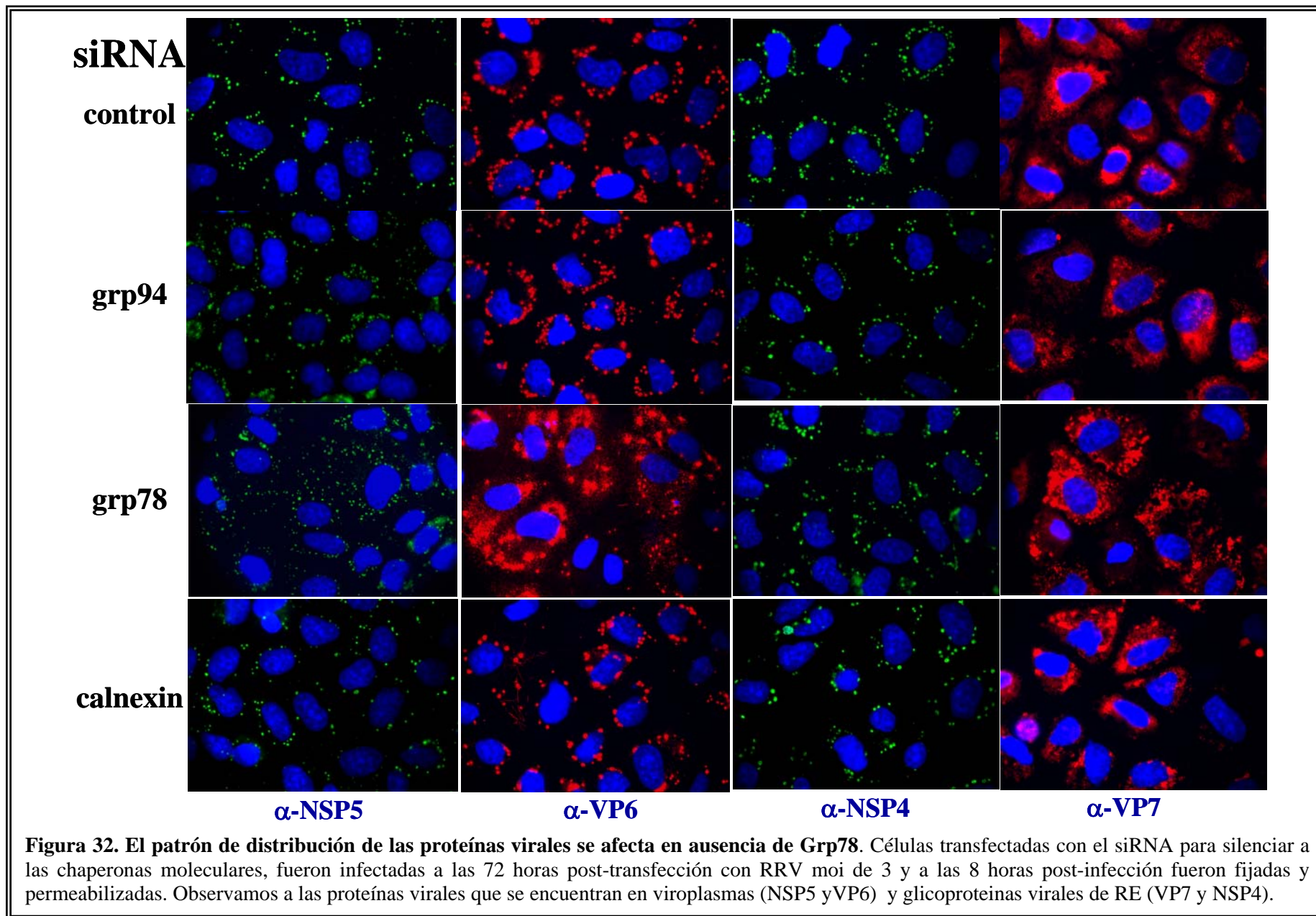
Analizamos si el patrón de las proteínas virales era modificado por la ausencia de Grp78 y calnexina. Para esto, hicimos inmunofluorescencias en células transfectadas con los siRNAs, las cuales fueron infectadas con RRV a una MOI de 3 y a las 8 hpi se fijaron y detectaron con anticuerpos para proteínas virales de viroplasmos (NSP5 y VP6) y proteínas virales del RE (VP7 y NSP4) (Figura 32). En estos ensayos encontramos que al transfectar células con el siRNA contra

Grp78, se observaron claras diferencias en la distribución de las proteínas virales, tanto de las proteínas que están en viroplasmos, como de las proteínas que se encuentran en RE, ya que dejan de tener una distribución perinuclear y parecen disgregarse por la célula formando agregados.

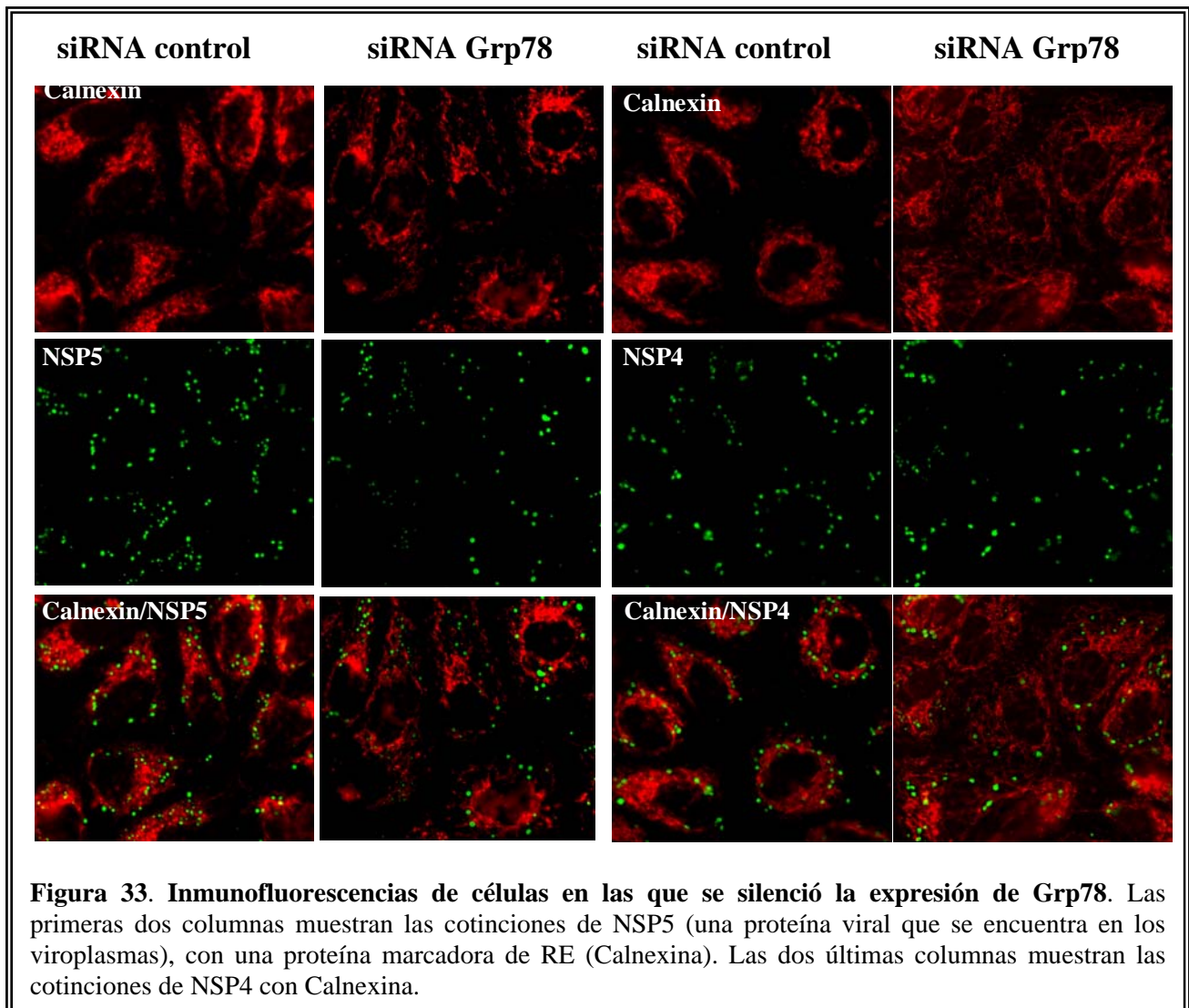
También al disminuir la cantidad de calnexina en las células parece haber cambios en el patrón de distribución de las proteínas virales, sin embargo aquí las proteínas en vez de disgregarse se ubican preferentemente muy cerca y alrededor del núcleo, esto también sucedió con todas las proteínas virales que observamos.

Al igual que las proteínas virales sufren modificaciones en su distribución en células en las que Grp78 se silenció, previamente habíamos observado que también algunas proteínas celulares, específicamente las chaperonas del RE, cambian su patrón de distribución (Figura 12). Una posibilidad es que las proteínas estuvieran saliendo del RE y dando esa apariencia desorganizada en la célula, la otra posibilidad es que el RE en sí se estuviera desorganizando. Para saber si el RE se estaba desorganizando al silenciar a Grp78, transfectamos a las células con los siRNAs, posteriormente las infectamos, y a las 8 hpi las fijamos para hacer cotinciones de proteínas virales (NSP5 y NSP4) con marcadores de RE (calnexina y calreticulina). Como podemos observar en la figura 33, existen cambios en la distribución de las proteínas marcadoras de RE al interferir a Grp78, así como cambios en la distribución de las proteínas virales que previamente habíamos observado (Figura 32). Por otro lado, no se ven cambios tan drásticos al interferir a calnexina. Estos resultados sugieren que al interferir a Grp78, las chaperonas moleculares, sufren un cambio de distribución, lo que podría deberse a una fragmentación del RE. Cabe mencionar que solamente se ha observado la fragmentación del RE cuando se trata a las células con agentes que afectan la concentración del calcio en este compartimiento, como lo son la taspigargina o el ionoforo de calcio A23187.

Una posibilidad es que en ausencia de Grp78, que es una proteína que une calcio en el RE, los niveles de este catión en este compartimiento se desestabilicen, lo cual, de cómo resultado una fragmentación del RE. Sin embargo, al interferir a otras chaperonas como Grp94, calnexina y calreticulina, las cuales también pueden unir calcio en este compartimiento, no se observaron cambios en el patrón de distribución de las proteínas marcadoras de RE, ni de las proteínas virales que se evaluaron (datos no mostrados). Por lo que puede ser que el cambio de distribución del RE no sea un mecanismo inducido principalmente con la variación en la concentración de calcio, sino más bien a una nueva función de Grp78 de dar estabilidad a este compartimiento.



Este hallazgo abre la posibilidad de analizar esta posible nueva función de Grp78 para mantener morfológicamente integro al RE, misma que no ha sido reportada en la literatura y que sería interesante caracterizar.



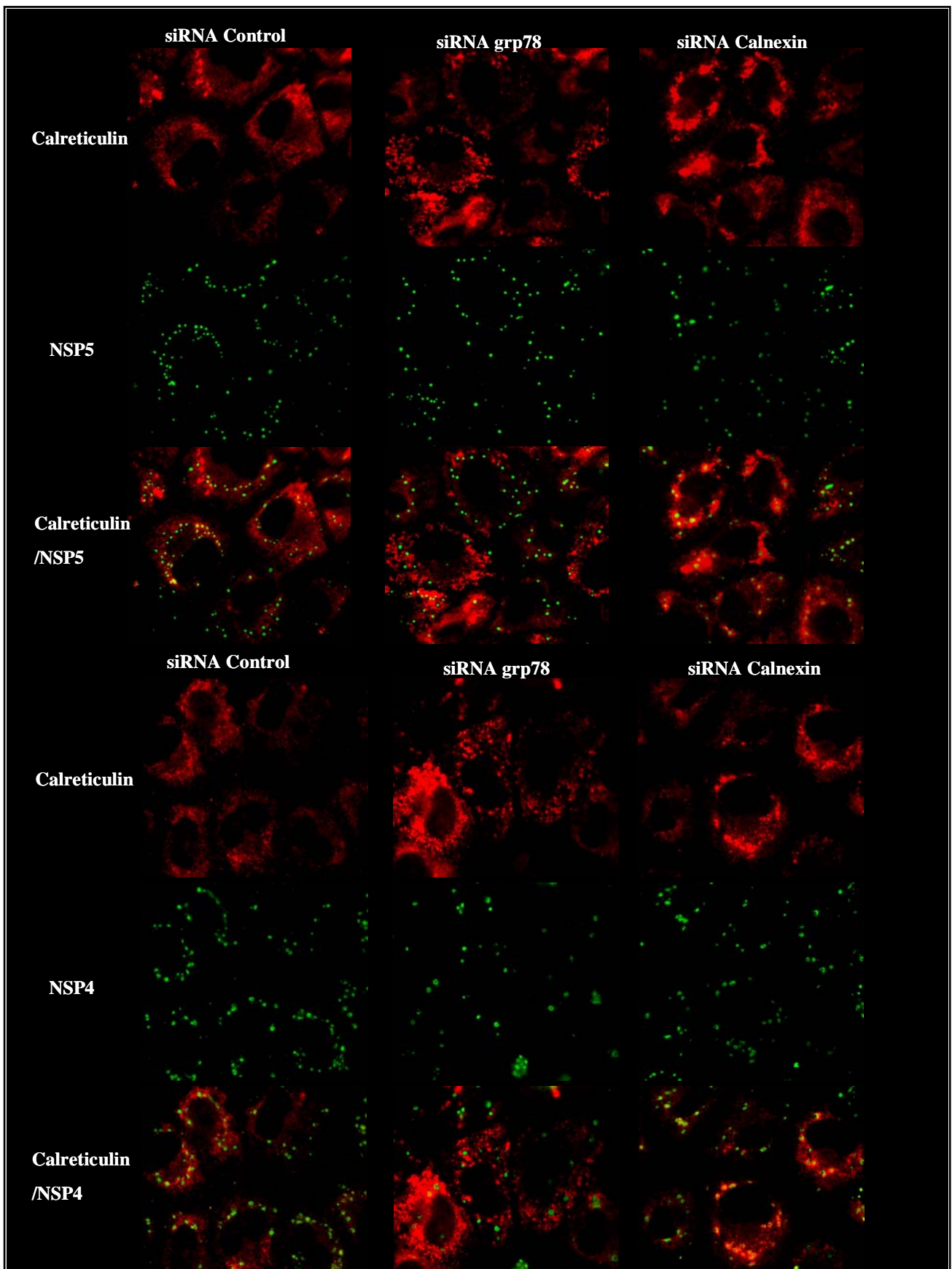


Figura 33. Inmunofluorescencias de células en las que se silenció la expresión de Grp78 y calnexina. Las primeras filas muestran las cotinciones de NSP5, con calreticulina. Las tres filas inferiores muestran las cotinciones de NSP4 con calreticulina.

REFERENCIAS

- Afrikanova,I., M.C.Miozzo, S.Giambiagi, and O.Burrone. 1996. "Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5." *J.Gen.Virol.* 77 (Pt 9):2059-2065.
- Altenburg,B.C., D.Y.Graham, and M.K.Estes. 1980. "Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells." *J.Gen.Virol.* 46:75-85.
- Anderson,R.G., J.R.Falck, J.L.Goldstein, and M.S.Brown. 1984. "Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:4838-4842.
- Au,K.S., W.K.Chan, J.W.Burns, and M.K.Estes. 1989. "Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28." *J.Virol.* 63:4553-4562.
- Au,K.S., W.K.Chan, and M.K.Estes. 1988. "Rotavirus Morphogenesis involves an endoplasmic reticulum transmembrane glycoprotein." In R.W.Compans, A.Helenius, and M.Oldstone, editors, *Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis*. Alan R. Liss. New York. 257-267.
- Au,K.S., N.M.Mattion, and M.K.Estes. 1993. "A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28." *Virology.* 194:665-673.
- Ball,J.M., P.Tian, C.Q.Zeng, A.P.Morris, and M.K.Estes. 1996. "Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein." *Science.* 272:101-104.
- Barro,M. and J.T.Patton. 2007. "Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7." *J.Virol.* 81:4473-4481.
- Berkova,Z., S.E.Crawford, G.Trugnan, T.Yoshimori, A.P.Morris, and M.K.Estes. 2006. "Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm." *J.Virol.* 80:6061-6071.
- Berois,M., C.Sapin, I.Erk, D.Poncet, and J.Cohen. 2003. "Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2." *J.Virol.* 77:1757-1763.
- Bishop,R.F., G.P.Davidson, I.H.Holmes, and B.J.Ruck. 1973. "Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis." *Lancet.* 2:1281-1283.
- Blackhall,J., M.Munoz, A.Fuentes, and G.Magnusson. 1998. "Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation." *J.Virol.* 72:6398-6405.
- Booth,C. and G.L.Koch. 1989. "Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins." *Cell.* 59:729-737.
- Buchner,J. 1999. "Hsp90 & Co. - a holding for folding." *Trends Biochem.Sci.* 24:136-141.
- Cabral,C.M., Y.Liu, K.W.Moremen, and R.N.Sifers. 2002. "Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs." *Mol.Biol.Cell.* 13:2639-2650.
- Cannon,K.S., D.N.Hebert, and A.Helenius. 1996. "Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin." *J.Biol.Chem.* 271:14280-14284.
- Chan,C.P., K.L.Siu, K.T.Chin, K.Y.Yuen, B.Zheng, and D.Y.Jin. 2006. "Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein." *J.Virol.* 80:9279-9287.
- Chan,W.K., K.S.Au, and M.K.Estes. 1988. "Topography of the simian rotavirus nonstructural glycoprotein (NS28) in the endoplasmic reticulum membrane." *Virology.* 164:435-442.
- Charpilienne,A., J.Lepault, F.Rey, and J.Cohen. 2002. "Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity." *J.Virol.* 76:7822-7831.
- Chasey,D. 1977. "Different Particle Types in Tissue Culture and Intestinal Epithelium Infected with Rotavirus." *J.Gen.Virol.* 37:443-451.

- Cho,D.Y., G.H.Yang, C.J.Ryu, and H.J.Hong. 2003. "Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus in vitro and in vivo." *J.Virol.* 77:2784-2788.
- Choukhi,A., S.Ung, C.Wychowski, and J.Dubuisson. 1998. "Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins." *J.Virol.* 72:3851-3858.
- Cohen,J. and P.Dobos. 1979. "Cell free transcription and translation of rotavirus RNA." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 88:791-796.
- Corbett,E.F., K.Oikawa, P.Francois, D.C.Tessier, C.Kay, J.J.Bergeron, D.Y.Thomas, K.H.Krause, and M.Michalak. 1999. "Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones." *J.Biol.Chem.* 274:6203-6211.
- Coulson,B.S., S.L.Londrigan, and D.J.Lee. 1997. "Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:5389-5394.
- Cox,J.S., C.E.Shamu, and P.Walter. 1993. "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." *Cell.* 73:1197-1206.
- 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.* 68:5945-5952.
- Cuadras,M.A., D.A.Feigelstock, S.An, and H.B.Greenberg. 2002. "Gene expression pattern in Caco-2 cells following rotavirus infection." *J.Virol.* 76:4467-4482.
- Delom,F., B.Mallet, P.Carayon, and P.J.Lejeune. 2001. "Role of extracellular molecular chaperones in the folding of oxidized proteins. Refolding of colloidal thyroglobulin by protein disulfide isomerase and immunoglobulin heavy chain-binding protein." *J.Biol.Chem.* 276:21337-21342.
- Donati,G., C.Imbriano, and R.Mantovani. 2006. "Dynamic recruitment of transcription factors and epigenetic changes on the ER stress response gene promoters." *Nucleic Acids Res.* 34:3116-3127.
- Dong,Y., C.Q.Zeng, J.M.Ball, M.K.Estes, and A.P.Morris. 1997. "The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:3960-3965.
- Dormitzer,P.R. and H.B.Greenberg. 1992. "Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7." *Virology.* 189:828-832.
- Dormitzer,P.R., H.B.Greenberg, and S.C.Harrison. 2000. "Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers." *Virology.* 277:420-428.
- Dubuisson,J. and C.M.Rice. 1996. "Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin." *J.Virol.* 70:778-786.
- Earl,P.L., B.Moss, and R.W.Doms. 1991. "Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." *J.Virol.* 65:2047-2055.
- Eichwald,C., G.Jacob, B.Muszynski, J.E.Allende, and O.R.Burrone. 2004. "Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:16304-16309.
- Elbashir,S.M., J.Harborth, W.Lendeckel, A.Yalcin, K.Weber, and T.Tuschl. 2001. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature.* 411:494-498.
- Ellgaard,L., M.Molinari, and A.Helenius. 1999. "Setting the standards: quality control in the secretory pathway." *Science.* 286:1882-1888.
- Ericson,B.L., D.Y.Graham, B.B.Mason, and M.K.Estes. 1982. "Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells." *J.Virol.* 42:825-839.

- Ericson, B.L., D.Y. Graham, B.B. Mason, H.H. Hanssen, and M.K. Estes. 1983. "Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11." *Virology*. 127:320-332.
- Estes, M.K. 1996. "Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development." *J. Infect. Dis.* 174 Suppl 1:S37-S46.
- Estes, M.K. 2001. "Rotaviruses and their replication." In D.M. Knipe and P.M. Howley, editors, *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 1747-1785.
- Estes, M.K. and J. Cohen. 1989. "Rotavirus gene structure and function." *Microbiol. Rev.* 53:410-449.
- Estes, M.K. and D.Y. Graham. 1985. "Rotavirus antigens." *Adv. Exp. Med. Biol.* 185:201-214.
- Estes, M.K., D.Y. Graham, and B.B. Mason. 1981. "Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms." *J. Virol.* 39:879-888.
- Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, and O.R. Burrone. 1999. "Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo." *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 2):333-339.
- Fang, Z.Y., R.I. Glass, M. Penaranda, H. Dong, S.S. Monroe, L. Wen, M.K. Estes, J. Eiden, R.H. Yolken, L. Saif, and . 1989. "Purification and characterization of adult diarrhea rotavirus: identification of viral structural proteins." *J. Virol.* 63:2191-2197.
- Fewell, S.W., K.J. Travers, J.S. Weissman, and J.L. Brodsky. 2001. "The action of molecular chaperones in the early secretory pathway." *Annu. Rev. Genet.* 35:149-191.
- Freedman, R.B. 1989. "Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins." *Cell.* 57:1069-1072.
- 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.
- Gardet, A., M. Breton, P. Fontanges, G. Trugnan, and S. Chwetzoff. 2006. "Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies." *J. Virol.* 80:3947-3956.
- Gaudin, Y. 1997. "Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones." *J. Virol.* 71:3742-3750.
- Gilber, J.M., N. Feng, J.T. Patton, and H.B. Greenberg. 2001. "Rotavirus assembly - interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6." *Arch. Virol.* 146:1155-1171.
- Gilbert, J., W. Ou, J. Silver, and T. Benjamin. 2006. "Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus." *J. Virol.* 80:10868-10870.
- Gonzalez, R.A., R. Espinosa, P. Romero, S. Lopez, and C.F. Arias. 2000. "Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells." *Arch. Virol.* 145:1963-1973.
- Gonzalez, R.A., M.A. Torres-Vega, S. Lopez, and C.F. Arias. 1998. "In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins." *Arch. Virol.* 143:981-996.
- Gonzalez, S.A. and O.R. Burrone. 1991. "Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine." *Virology*. 182:8-16.
- Gorziglia, M., C. Larrea, F. Liprandi, and J. Esparza. 1985. "Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses." *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 9):1889-1900.
- Griffiths, G. and P. Rottier. 1992. "Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway." *Semin. Cell Biol.* 3:367-381.
- Grinna, L.S. and P.W. Robbins. 1979. "Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides." *J. Biol. Chem.* 254:8814-8818.

- Hammond,C. and A.Helenius. 1993. "A chaperone with a sweet tooth." *Curr.Biol.* 3:884-886.
- Hammond,C. and A.Helenius. 1994a. "Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin." *Science.* 266:456-458.
- Hammond,C. and A.Helenius. 1994b. "Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus." *J.Cell Biol.* 126:41-52.
- Hammond,C. and A.Helenius. 1995. "Quality control in the secretory pathway." *Curr.Opin.Cell Biol.* 7:523-529.
- Hampton,R.Y. 2002. "ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation." *Curr.Opin.Cell Biol.* 14:476-482.
- Helenius,A. and M.Aebi. 2001. "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science.* 291:2364-2369.
- Helenius,A. and M.Aebi. 2004. "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu.Rev.Biochem.* 73:1019-1049.
- Hewish,M.J., Y.Takada, and B.S.Coulson. 2000. "Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells." *J.Virol.* 74:228-236.
- Hobman,T.C. 1993. "Targeting of viral glycoproteins to the Golgi complex." *Trends Microbiol.* 1:124-130.
- Hong,M., S.Luo, P.Baumeister, J.M.Huang, R.K.Gogia, M.Li, and A.S.Lee. 2004. "Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response." *J.Biol.Chem.* 279:11354-11363.
- Horie,Y., O.Nakagomi, Y.Koshimura, T.Nakagomi, Y.Suzuki, T.Oka, S.Sasaki, Y.Matsuda, and S.Watanabe. 1999. "Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system." *Virology.* 262:398-407.
- Hoshino,Y. and A.Z.Kapikian. 1994. "Rotavirus antigens." *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 185:179-227.
- Hubbard,S.C. and R.J.Ivatt. 1981. "Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu.Rev.Biochem.* 50:555-583.
- Hunter,E. 2007. "Virus Assembly." In D.M.Knipe and P.M.Howley, editors, *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 141-168.
- Hurtley,S.M., D.G.Bole, H.Hoover-Litty, A.Helenius, and C.S.Copeland. 1989. "Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP)." *J.Cell Biol.* 108:2117-2126.
- Imai,M., K.Akatani, N.Ikegami, and Y.Furuichi. 1983. "Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments." *J.Virol.* 47:125-136.
- Jayaram,H., Z.Taraporewala, J.T.Patton, and B.V.Prasad. 2002. "Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold." *Nature.* 417:311-315.
- Jindadamrongwech,S., C.Thepparit, and D.R.Smith. 2004. "Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2." *Arch.Virol.* 149:915-927.
- Kabcenell,A.K. and P.H.Atkinson. 1985. "Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11." *J.Cell Biol.* 101:1270-1280.
- 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.* 62:2929-2941.
- Kapikian,A.Z., Y.Hoshino, and R.M.Chanock. 2001. "Rotaviruses." In D.M.Knipe and P.M.Howley, editors, *Fields of Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 1787-1834.
- Kassenbrock,C.K. and R.B.Kelly. 1989. "Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides." *EMBO J.* 8:1461-1467.

- Kaufman,R.J. 1999. "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." *Genes Dev.* 13:1211-1233.
- Knarr,G., S.Modrow, A.Todd, M.J.Gething, and J.Buchner. 1999. "BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip." *J.Biol.Chem.* 274:29850-29857.
- Koch,G.L., C.Booth, and F.B.Wooding. 1988. "Dissociation and re-assembly of the endoplasmic reticulum in live cells." *J.Cell Sci.* 91 (Pt 4):511-522.
- Kornfeld,R. and S.Kornfeld. 1985. "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu.Rev.Biochem.* 54:631-664.
- Kuznetsov,G., L.B.Chen, and S.K.Nigam. 1997. "Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum." *J.Biol.Chem.* 272:3057-3063.
- Lee,A.S. 1992. "Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family." *Curr.Opin.Cell Biol.* 4:267-273.
- Leitzgen,K., M.R.Knittler, and I.G.Haas. 1997. "Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding." *J.Biol.Chem.* 272:3117-3123.
- Li,W.W., S.Alexandre, X.Cao, and A.S.Lee. 1993. "Transactivation of the grp78 promoter by Ca²⁺ depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin." *J.Biol.Chem.* 268:12003-12009.
- Li,X.A. and A.S.Lee. 1991. "Competitive inhibition of a set of endoplasmic reticulum protein genes (GRP78, GRP94, and ERp72) retards cell growth and lowers viability after ionophore treatment." *Mol.Cell Biol.* 11:3446-3453.
- Liberek,K., J.Marszalek, D.Ang, C.Georgopoulos, and M.Zylicz. 1991. "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:2874-2878.
- Little,E., M.Ramakrishnan, B.Roy, G.Gazit, and A.S.Lee. 1994. "The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications." *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 4:1-18.
- Liu,M., N.M.Mattion, and M.K.Estes. 1992. "Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity." *Virology.* 188:77-84.
- Livak,K.J. and T.D.Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods.* 25:402-408.
- Lodish,H., A.Berk, S.L.Zipursky, P.Matsudaira, D.Baltimore, and J.E.Darnell. 2000. "Biomembranes and subcellular organization of eukaryotic cells." *Molecular Cell Biology.* W H Freeman & Co. New York.
- Lopez,S. and C.F.Arias. 2004. "Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance." *Trends Microbiol.* 12:271-278.
- Lopez,T., M.Camacho, M.Zayas, R.Najera, R.Sanchez, C.F.Arias, and S.Lopez. 2005. "Silencing the morphogenesis of rotavirus." *J.Virol.* 79:184-192.
- Ludert,J.E., N.Feng, J.H.Yu, R.L.Broome, Y.Hoshino, and H.B.Greenberg. 1996. "Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo." *J.Virol.* 70:487-493.
- Ma,Y. and L.M.Hendershot. 2004. "ER chaperone functions during normal and stress conditions." *J.Chem.Neuroanat.* 28:51-65.
- Maass,D.R. and P.H.Atkinson. 1994. "Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues." *J.Virol.* 68:366-378.
- Macer,D.R. and G.L.Koch. 1988. "Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum." *J.Cell Sci.* 91 (Pt 1):61-70.
- Matsuoka,Y., S.Y.Chen, and R.W.Compans. 1991. "Bunyavirus protein transport and assembly." *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 169:161-179.

- McCrae, M.A. and J.G. McCorquodale. 1983. "Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species." *Virology*. 126:204-212.
- McNulty, M.S., W.L. Curran, and J.B. McFerran. 1976. "The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells." *J. Gen. Virol.* 33:503-508.
- Meunier, L., Y.K. Usherwood, K.T. Chung, and L.M. Hendershot. 2002. "A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins." *Mol. Biol. Cell.* 13:4456-4469.
- Meyer, J.C., C.C. Bergmann, and A.R. Bellamy. 1989. "Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28." *Virology*. 171:98-107.
- Michelangeli, F., F. Liprandi, M.E. Chemello, M. Ciarlet, and M.C. Ruiz. 1995. "Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect." *J. Virol.* 69:3838-3847.
- Michelangeli, F., M.C. Ruiz, J.R. del Castillo, J.E. Ludert, and F. Liprandi. 1991. "Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells." *Virology*. 181:520-527.
- 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.* 72:8705-8709.
- Mirazimi, A. and L. Svensson. 1998. "Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7." *J. Virol.* 72:3887-3892.
- Mirazimi, A. and L. Svensson. 2000. "ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7." *J. Virol.* 74:8048-8052.
- Mirazimi, A., C.H. von Bonsdorff, and L. Svensson. 1996. "Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing." *Virology*. 217:554-563.
- Molinari, M., K.K. Eriksson, V. Calanca, C. Galli, P. Cresswell, M. Michalak, and A. Helenius. 2004. "Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control." *Mol. Cell.* 13:125-135.
- Molinari, M., C. Galli, V. Piccaluga, M. Pieren, and P. Paganetti. 2002. "Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER." *J. Cell Biol.* 158:247-257.
- Molinari, M. and A. Helenius. 2000. "Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum." *Science*. 288:331-333.
- Molinari, M. and R. Sitia. 2005. "The secretory capacity of a cell depends on the efficiency of endoplasmic reticulum-associated degradation." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300:1-15.
- Montero, H., C.F. Arias, and S. Lopez. 2006b. "Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis." *J. Virol.* 80:9031-9038.
- Montero, H., C.F. Arias, and S. Lopez. 2006a. "Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis." *J. Virol.* 80:9031-9038.
- Mori, K., W. Ma, M.J. Gething, and J. Sambrook. 1993. "A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus." *Cell*. 74:743-756.
- Mossel, E.C. and R.F. Ramig. 2003. "A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse." *J. Virol.* 77:12352-12356.
- Mulvey, M. and D.T. Brown. 1995. "Involvement of the molecular chaperone BiP in maturation of Sindbis virus envelope glycoproteins." *J. Virol.* 69:1621-1627.
- Munro, S. and H.R. Pelham. 1987. "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." *Cell*. 48:899-907.
- Musalem, C. and R.T. Espejo. 1985. "Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11." *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 12):2715-2724.

- Nguyen,T.H., D.T.Law, and D.B.Williams. 1991. "Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:1565-1569.
- Nishikawa,S.I., S.W.Fewell, Y.Kato, J.L.Brodsky, and T.Endo. 2001. "Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation." *J.Cell Biol.* 153:1061-1070.
- Oberdorf,J., E.J.Carlson, and W.R.Skach. 2001. "Redundancy of mammalian proteasome beta subunit function during endoplasmic reticulum associated degradation." *Biochemistry.* 40:13397-13405.
- Otteken,A. and B.Moss. 1996. "Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin." *J.Biol.Chem.* 271:97-103.
- Ou,W.J., J.J.Bergeron, Y.Li, C.Y.Kang, and D.Y.Thomas. 1995. "Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca²⁺." *J.Biol.Chem.* 270:18051-18059.
- Pando,V., P.Isa, C.F.Arias, and S.Lopez. 2002. "Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection." *Virology.* 295:190-200.
- Parashar,U.D. 2004. "The global epidemiology of rotavirus disease." Sixth International Rotavirus Symposium. Mexico City. (2004).
- Patton,J.T. 1995. "Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins." *J.Gen.Virol.* 76 (Pt 11):2633-2644.
- Patton,J.T. 2001. "Rotavirus RNA replication and gene expression." *Novartis.Found.Symp.* 238:64-77.
- Patton,J.T., M.T.Jones, A.N.Kalbach, Y.W.He, and J.Xiaobo. 1997. "Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome." *J.Virol.* 71:9618-9626.
- Patton,J.T. and E.Spencer. 2000. "Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses." *Virology.* 277:217-225.
- Patton,J.T., M.Wentz, J.Xiaobo, and R.F.Ramig. 1996. "cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA." *J.Virol.* 70:3961-3971.
- Pedley,S., J.C.Bridger, J.F.Brown, and M.A.McCrae. 1983. "Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens." *J.Gen.Virol.* 64 (Pt 10):2093-2101.
- Pelham,H.R. 1989. "Control of protein exit from the endoplasmic reticulum." *Annu.Rev.Cell Biol.* 5:1-23.
- Pelham,H.R. 1991. "Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex." *Curr.Opin.Cell Biol.* 3:585-591.
- Perez-Vargas,J., P.Isa, S.Lopez, and C.F.Arias. 2006. "Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits." *Arch.Med.Res.* 37:1-10.
- Peterson,J.R., A.Ora, P.N.Van, and A.Helenius. 1995. "Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins." *Mol.Biol.Cell.* 6:1173-1184.
- Petrie,B.L., M.K.Estes, and D.Y.Graham. 1983. "Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity." *J.Virol.* 46:270-274.
- Petrie,B.L., D.Y.Graham, H.Hanssen, and M.K.Estes. 1982. "Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry." *J.Gen.Virol.* 63:457-467.
- Pettersson,R.F. 1991. "Protein localization and virus assembly at intracellular membranes." *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 170:67-106.
- Pieren,M., C.Galli, A.Denzel, and M.Molinari. 2005. "The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins." *J.Biol.Chem.* 280:28265-28271.

- Piron,M., P.Vende, J.Cohen, and D.Poncet. 1998. "Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F." *EMBO J.* 17:5811-5821.
- 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.* 114:651-656.
- 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.* 101:2199-2209.
- Prasad,B.V., J.W.Burns, E.Marietta, M.K.Estes, and W.Chiu. 1990. "Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy." *Nature.* 343:476-479.
- Prasad,B.V., G.J.Wang, J.P.Clerx, and W.Chiu. 1988. "Three-dimensional structure of rotavirus." *J.Mol.Biol.* 199:269-275.
- Rajagopalan,S. and M.B.Brenner. 1994. "Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum." *J.Exp.Med.* 180:407-412.
- Ramig,R.F. 2004. "Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection." *J.Virol.* 78:10213-10220.
- Rao,R.V., A.Peel, A.Logvinova, G.del Rio, E.Hermel, T.Yokota, P.C.Goldsmith, L.M.Ellerby, H.M.Ellerby, and D.E.Bredesen. 2002. "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78." *FEBS Lett.* 514:122-128.
- Resendez E Jr, J.W.Attenello, A.Grafsky, C.S.Chang, and A.S.Lee. 1985. "Calcium ionophore A23187 induces expression of glucose-regulated genes and their heterologous fusion genes." *Mol.Cell Biol.* 5:1212-1219.
- Rose,M.D., L.M.Misra, and J.P.Vogel. 1989. "KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene." *Cell.* 57:1211-1221.
- Roseto,A., J.Escaig, E.Delain, J.Cohen, and R.Scherrer. 1979. "Structure of rotaviruses as studied by the freeze-drying technique." *Virology.* 98:471-475.
- Rothman,J.E. 1989. "Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells." *Cell.* 59:591-601.
- Ruggeri,F.M. and H.B.Greenberg. 1991. "Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture." *J.Virol.* 65:2211-2219.
- Sapin,C., O.Colard, O.Delmas, C.Tessier, M.Breton, V.Enouf, S.Chwetzoff, J.Ouanich, J.Cohen, C.Wolf, and G.Trugnan. 2002. "Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells." *J.Virol.* 76:4591-4602.
- Schroder,M. and R.J.Kaufman. 2005. "The mammalian unfolded protein response." *Annu.Rev.Biochem.* 74:739-789.
- Sereno,M.M. and M.I.Gorziglia. 1994. "The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type." *Virology.* 199:500-504.
- Shahrabadi,M.S. and P.W.Lee. 1986. "Bovine rotavirus maturation is a calcium-dependent process." *Virology.* 152:298-307.
- Shang,J. and M.A.Lehrman. 2004. "Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 317:390-396.
- Shen,J., X.Chen, L.Hendershot, and R.Prywes. 2002. "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." *Dev.Cell.* 3:99-111.
- Silvestri,L.S., M.A.Tortorici, R.Vasquez-Del Carpio, and J.T.Patton. 2005. "Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell." *J.Virol.* 79:15165-15174.
- Sitia,R. and I.Braakman. 2003. "Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory." *Nature.* 426:891-894.

- Smith, J.A., S.C. Schmechel, A. Raghavan, M. Abelson, C. Reilly, M.G. Katze, R.J. Kaufman, P.R. Bohjanen, and L.A. Schiff. 2006. "Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response." *J. Virol.* 80:2019-2033.
- Snapp, E.L., A. Sharma, J. Lippincott-Schwartz, and R.S. Hegde. 2006. "Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:6536-6541.
- Solda, T., N. Garbi, G.J. Hammerling, and M. Molinari. 2006. "Consequences of ERp57 deletion on oxidative folding of obligate and facultative clients of the calnexin cycle." *J. Biol. Chem.* 281:6219-6226.
- Sousa, M. and A.J. Parodi. 1995. "The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." *EMBO J.* 14:4196-4203.
- Stephens, E.B. and R.W. Compans. 1988. "Assembly of animal viruses at cellular membranes." *Annu. Rev. Microbiol.* 42:489-516.
- Stirzaker, S.C. and G.W. Both. 1989. "The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein." *Cell.* 56:741-747.
- Sullivan, D.C., L. Huminiecki, J.W. Moore, J.J. Boyle, R. Poulosom, D. Creamer, J. Barker, and R. Bicknell. 2003. "EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor." *J. Biol. Chem.* 278:47079-47088.
- Suzuki, C.K., J.S. Bonifacino, A.Y. Lin, M.M. Davis, and R.D. Klausner. 1991. "Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP." *J. Cell Biol.* 114:189-205.
- Svensson, L., P.R. Dormitzer, C.H. von Bonsdorff, L. Maunula, and H.B. Greenberg. 1994. "Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly." *J. Virol.* 68:5204-5215.
- Taraporewala, Z., D. Chen, and J.T. Patton. 1999a. "Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity." *J. Virol.* 73:9934-9943.
- Taraporewala, Z., D. Chen, and J.T. Patton. 1999b. "Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity." *J. Virol.* 73:9934-9943.
- Taraporewala, Z.F., X. Jiang, R. Vasquez-Del Carprio, H. Jayaram, B.V. Prasad, and J.T. Patton. 2006. "Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system." *J. Virol.* 80:7984-7994.
- Taraporewala, Z.F. and J.T. Patton. 2004. "Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae." *Virus Res.* 101:57-66.
- Tatu, U. and A. Helenius. 1997. "Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum." *J. Cell Biol.* 136:555-565.
- 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.* 15:4469-4476.
- Tooze, J., S. Tooze, and G. Warren. 1984. "Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions." *Eur. J. Cell Biol.* 33:281-293.
- Trask, S.D. and P.R. Dormitzer. 2006. "Assembly of highly infectious rotavirus particles re-coated with recombinant outer capsid proteins." *J. Virol.* 80:11293-11304.
- Triantafilou, K., D. Fradelizi, K. Wilson, and M. Triantafilou. 2002. "GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization." *J. Virol.* 76:633-643.
- Tyson, J.R. and C.J. Stirling. 2000. "LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum." *EMBO J.* 19:6440-6452.

- van Leeuwen, J.E. and K.P. Kearse. 1996. "Calnexin associates exclusively with individual CD3 delta and T cell antigen receptor (TCR) alpha proteins containing incompletely trimmed glycans that are not assembled into multisubunit TCR complexes." *J. Biol. Chem.* 271:9660-9665.
- Vasquez, M., A.M. Sandino, J.M. Pizarro, J. Fernandez, S. Valenzuela, and E. Spencer. 1993. "Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis." *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 5):937-941.
- Vogel, J.P., L.M. Misra, and M.D. Rose. 1990. "Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast." *J. Cell Biol.* 110:1885-1895.
- Ware, F.E., A. Vassilakos, P.A. Peterson, M.R. Jackson, M.A. Lehrman, and D.B. Williams. 1995. "The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins." *J. Biol. Chem.* 270:4697-4704.
- Whitfeld, P.L., C. Tyndall, S.C. Storzaker, A.R. Bellamy, and G.W. Both. 1987. "Location of sequences within rotavirus SA11 glycoprotein VP7 which direct it to the endoplasmic reticulum." *Mol. Cell Biol.* 7:2491-2497.
- Wormald, M.R. and R.A. Dwek. 1999. "Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability." *Structure.* 7:R155-R160.
- 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.* 72:9865-9872.
- Yamashita, Y., M. Yamada, T. Daikoku, H. Yamada, A. Tadauchi, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama. 1996. "Calnexin associates with the precursors of glycoproteins B, C, and D of herpes simplex virus type 1." *Virology.* 225:216-222.
- Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori. 1998. "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." *J. Biol. Chem.* 273:33741-33749.
- Yu, Z., H. Luo, W. Fu, and M.P. Mattson. 1999. "The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis." *Exp. Neurol.* 155:302-314.
- Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, C.A. Guerrero, C.F. Arias, and S. Lopez. 2000. "Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3." *Virology.* 278:50-54.
- Zhang, M., C.Q. Zeng, A.P. Morris, and M.K. Estes. 2000. "A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells." *J. Virol.* 74:11663-11670.
- Zu, K., T. Bihani, A. Lin, Y.M. Park, K. Mori, and C. Ip. 2006. "Enhanced selenium effect on growth arrest by BiP/GRP78 knockdown in p53-null human prostate cancer cells." *Oncogene.* 25:546-554.