



Universidad Nacional Autónoma  
de México

---

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Departamento de genética del desarrollo y  
fisiología molecular

CARACTERIZACIÓN DEL INICIO DE LA  
TRANSCRIPCIÓN Y DESNUDAMIENTO DE  
ROTAVIRUS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
PRESENTA:

Alfonso Ocegüera Cabrera

Directora de tesis:

Dra. Susana López Charreton

Cuernavaca, Mor. Enero, 2012



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.

## Resumen

Rotavirus es uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis durante los primeros años de vida en los humanos y animales (Bagci, Eis-Hubinger et al. 2010). Pertenece a la familia *Reoviridae* y se caracteriza por ser un virus no envuelto de cápside icosaédrica y con genoma segmentado de RNA de doble cadena (dsRNA). Uno de los puntos clave para que la infección de los virus se lleve a cabo es su internalización al citoplasma celular, hasta ahora sabemos que los rotavirus entran a la célula mediante una vía endocítica, por lo que para alcanzar el citoplasma celular estos virus necesitan escaparse de los endosomas, sin embargo, aun no es claro en qué punto de la vía endocítica rotavirus entra al citosol celular. Por otro lado, la hipótesis más aceptada sobre el escape de los rotavirus menciona que durante este proceso la partícula infecciosa pierde la capa externa de la cápside viral en un proceso denominado desnudamiento, y la partícula resultante de este proceso (DLP) es transcripcionalmente activa. En este trabajo nosotros correlacionamos el momento en el que comenzamos a detectar mRNA con el momento de desnudamiento de rotavirus y por otro lado correlacionamos el momento en el que comenzamos a detectar mRNA citoplásmico con el momento en el que RRV se llega al citosol celular.

Por otra parte, el genoma de rotavirus consta de 11 segmentos de dsRNA por lo que para asegurarse del empaquetamiento de todo el genoma evoluciono un mecanismo en el que los procesos de replicación, empaquetamiento, así como los primeros pasos del ensamble de la partícula viral son eventos coordinados. Aunque estos procesos son pobremente entendidos existen 2 hipótesis que tratan de explicar cómo es que se lleva a cabo estos procesos, sin embargo estas dos hipótesis parten del supuesto de que el RNA genómico de rotavirus nunca se encuentra libre en citoplasma, y que los intermediarios de morfogénesis viral solo se encuentran dentro de estructuras denominadas viroplasma. Sin embargo, en el laboratorio se ha logrado demostrar la existencia de dsRNA viral citoplásmico lo que es un indicio de que la distribución celular de partículas proteínas y RNAs virales no es como se pensaba. Por lo que, en este trabajo realizamos una caracterización de la localización de proteínas, partículas y el RNA viral a lo largo del ciclo de infección.

# Índice

<i>Resumen</i>	II
<i>Índice</i>	III
<i>Índice de figuras</i>	V
<i>A mi familia</i>	VII
<i>Agradecimientos</i>	VIII
<i>A los miembros del grupo Arias/López por sus observaciones y amistad durante el desarrollo del presente trabajo.</i>	VIII
<i>Introducción</i>	1
<i>Rotavirus</i>	1
<i>Estructura</i>	2
<i>Ciclo de replicación</i>	3
<i>Transcripción viral</i>	4
<i>Replicación, empaquetamiento y ensamblaje viral</i>	8
<i>Virus y Endocitosis</i>	10
<i>Entrada de rotavirus</i>	14
<i>Hipótesis</i>	17
<i>Objetivos</i>	17
<i>Metodología</i>	18
<i>Cultivo celular</i>	18
<i>Infección</i>	18
<i>FISH</i>	18
<i>Inmunofluorescencia</i>	19
<i>Lista de anticuerpos utilizados</i>	20
<i>Tratamiento con inhibidores</i>	20
<i>Crecimiento de bacterias, extracción de plásmido y purificación de DNA plasmídico</i>	21
<i>Transcripción in vitro</i>	21

<i>Fraccionamiento con Digitonina</i> _____	22
<i>PCR</i> _____	22
<i>PCR en tiempo real, (qRT-PCR)</i> _____	23
<i>Marcaje Radioactivo y autoradiografías</i> _____	24
<i>Western blot</i> _____	24
<i>Resultados</i> _____	25
<i>Papel de citoesqueleto en la entrada de RV</i> _____	25
<i>Actina</i> _____	25
<i>Tubulina</i> _____	28
<i>Papel del citoesqueleto de actina en la entrada de RV</i> _____	31
<i>Papel del citoesqueleto de tubulina en la entrada de RV</i> _____	33
<i>Detección organelo-citoplasma de proteínas virales</i> _____	34
<i>Detección organelo-citoplasma de partículas virales</i> _____	42
<i>Detección de RNA viral</i> _____	48
<i>Inicio de la transcripción durante la infección</i> _____	49
<i>Hibridación in situ</i> _____	50
<i>Caracterización del inicio de la transcripción</i> _____	52
<i>Identificación de compartimiento celular donde inicia la transcripción</i> _____	54
<i>Escape de RV</i> _____	57
<i>Discusión</i> _____	61
<i>Inicio de la transcripción y distribución de RNA viral</i> _____	61
<i>Endocitosis y entrada de RV</i> _____	62
<i>Distribución organelo-citosol de proteínas y partículas virales</i> _____	64
<i>Replicación de RV y sub-partículas virales</i> _____	65
<i>Conclusiones</i> _____	67
<i>Referencias</i> _____	68

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Características estructurales de RV</i> .....	1
<i>Figura 2. Ciclo de replicación</i> .....	3
<i>Figura 3.- Replicación y empaquetamiento del genoma viral</i> .....	7
<i>Figura 4. Mecanismo de entrada de RV</i> .....	14
<i>Figura 5. Determinación del tiempo en que Citocalasina D ejerce su máxima inhibición</i> ...	26
<i>Figura 6. Duración del efecto de Citocalasina D en células MA 104</i> .....	27
<i>Figura 7. Determinación del tiempo en el que el nocodazol alcanza su efecto máximo</i> .....	29
<i>Figura 8. Duración del efecto del nocodazol sobre los microtúbulos</i> .....	30
<i>Figura 9. Determinación del papel de los microfilamentos en la entrada de RV</i> .....	32
<i>Figura 10. Determinación del papel de los microtúbulos en la entrada de RV</i> .....	34
<i>Figura 11. Fraccionamiento de células durante las primeras horas de infección</i> .....	35
<i>Figura 12. Localización de proteínas virales por medio de WB</i> .....	38
<i>Figura 13. Comparación organelo-citoplasma de síntesis de novo de proteínas virales</i> ....	41
<i>Figura 14. Distribución organelo-citoplasma de partículas virales</i> .....	44
<i>Figura 15. Detección de proteínas agregadas citosolicas.</i> .....	45
<i>Figura 16. Proteínas formadoras de complejo en la fracción citoplasmica</i> .....	46
<i>Figura 17. Detección de progenie viral organelo-citoplasmica</i> .....	47
<i>Figura 18. Detección de RNA viral particulado y no particulado</i> .....	48
<i>Figura 19. Obtención de la sonda de RNA del segmento 10</i> .....	50
<i>Figura 20. Hibridación in situ</i> .....	52
<i>Figura 21. Inicio de la transcripción</i> .....	53
<i>Figura 22. PCR de RNA total viral de las muestras del fraccionamiento</i> .....	55
<i>Figura 23. Cuantificación de mRNA y dsRNA en fracciones organelo-citoplasma por medio de RT-PCR</i> .....	57
<i>Figura 24. Inhibición de EEA1, Rab5 y Rab7 mediante siRNAs</i> .....	58
<i>Figura 25. Concentración organelo-citoplásmica de RNA viral en células tratadas con siRNAs</i> .....	60

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. El proyecto contó con apoyo de los donativos IN2114113 de la GAPA/UNAM y 153639 de conacyt

Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT.

*A mi familia*

## Agradecimientos

A la Dra. Susana López Charretón por su asesoría durante todo el desarrollo del proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial su guía durante el desarrollo del presente trabajo:

Dr. Ramón González García Conde

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

A los miembros de jurado por su tiempo, dedicación y sugerencias:

Dra. Susana Castro Obregón

Dr. Ramón González García Conde

Dr. Iván Martínez Dunker

Dra. Denhí Schnabel Peraza

Dra. Leonor Pérez Martínez

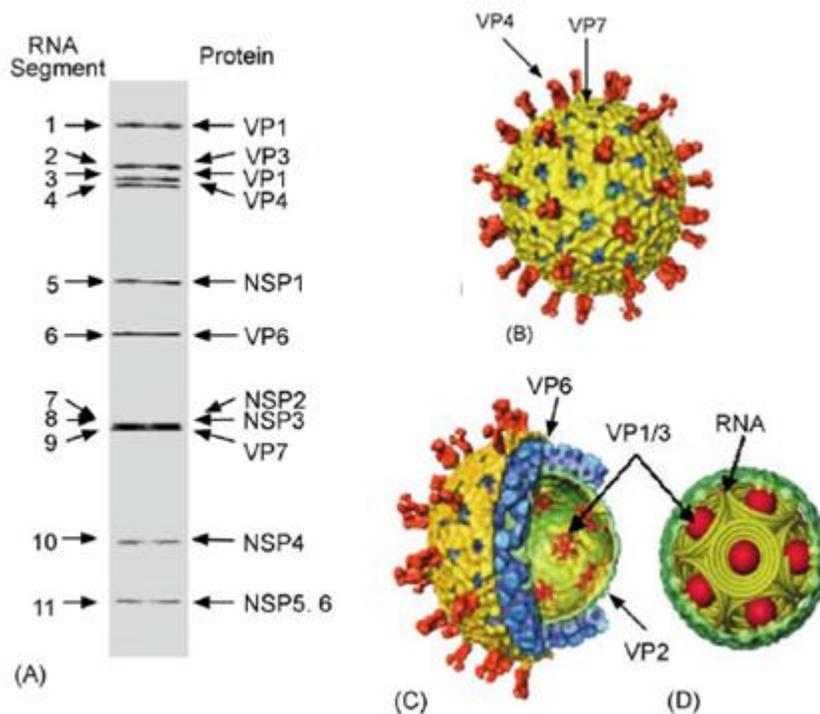
A los miembros del grupo Arias/López por sus observaciones y amistad durante el desarrollo del presente trabajo.

A los Amigos, gracias por su ánimo, amistad y compañía.

# Introducción

## Rotavirus

Rotavirus (RV) es uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis durante los primeros años de vida en los humanos y animales (Bagci, Eis-Hubinger et al. 2010). Pertenece a la familia *Reoviridae* y se caracteriza por ser un virus no envuelto de cápside icosaédrica y con genoma segmentado de RNA de doble cadena (dsRNA).

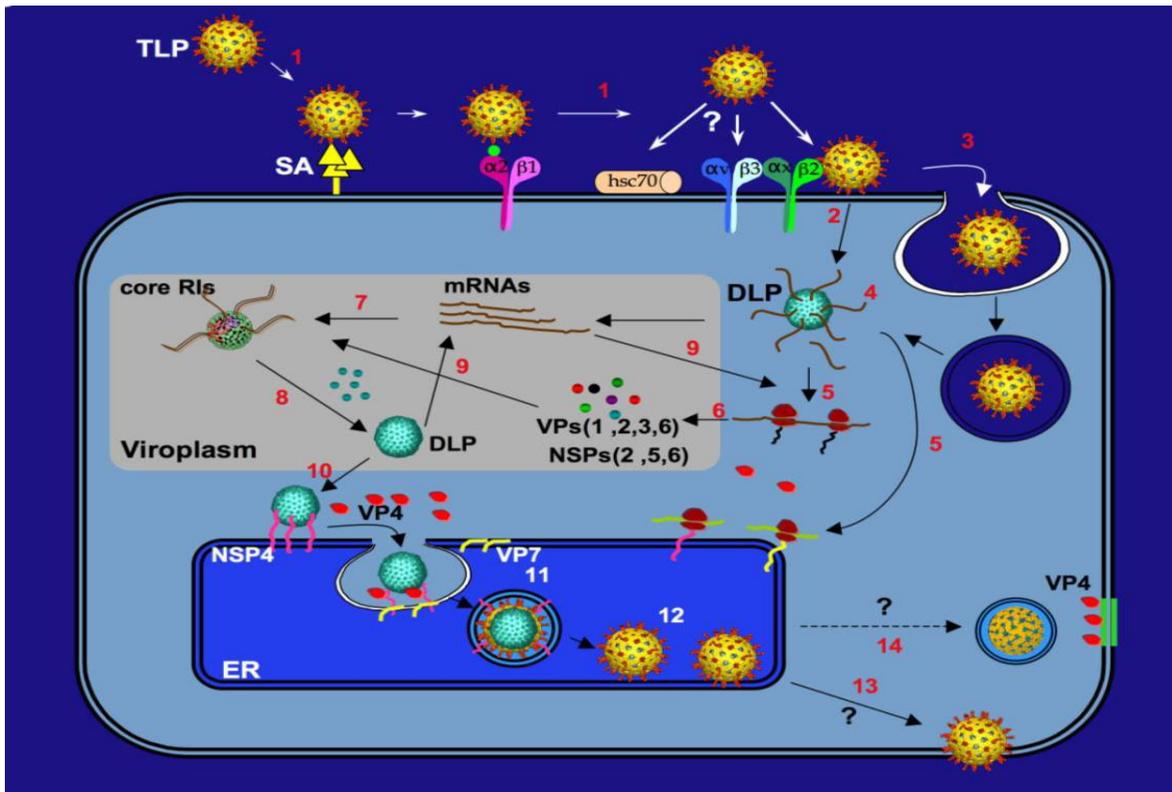


**Figura 1. Características estructurales de RV**

**A)** Gel de acrilamida en el que se muestra el genoma de RV, a excepción del segmento 11 todos los RNA de RV son monocistrónicos. **B)** Imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica de una partícula tri-laminar (TLP) de RV, en rojo están representadas las espículas formadas por VP4 y en amarillo están representados los trímeros de VP7. **C)** Corte de una TLP en donde se muestran las capas interna de VP6 (azul), y VP2 (verde) así como las enzimas transcripcionales VP1 y VP3 (rojo). **D)** corte transversal de la capa mas interna de RV en el que se representa la organización del genoma, cada uno de los segmentos está representado como un espiral cónico rodeando la maquinaria de transcripción viral en los “five fold axes (eje de simetría 5)”. Tomado de Jayaram, 2004.

## **Estructura**

La cápside de RV, como la de todos los virus es una estructura que protege al genoma y permite la entrada del virus a una célula huésped en donde se llevará a cabo el ciclo de replicación viral. Los viriones (partículas infecciosas completas) de RV o TLPs (del inglés Triple Layered Particle) constan de 3 capas concéntricas formadas por proteínas virales, sin embargo existen otras 2 posibles formas de partículas rotavirales, las partículas bilaminares o DLP (del inglés Double Layered Particle), que están descritas como partículas rugosas ya que en su periferia muestran proyecciones de subunidades triméricas de la cápside interna, y las partículas unilaminares o SLP (por sus siglas en inglés, SLP) (Jayaram, Estes et al. 2004). La capa externa de RV forma una estructura icosaédrica con una T=13, consta de 780 moléculas de la proteína VP7 arregladas en trímeros y 60 espículas constituidas por la proteína VP4 (Fig. 1 panel B), la estructura externa envuelve a la capa intermedia que está constituida por 780 moléculas de VP6 arregladas en trímeros, y finalmente la capa más interna de la cápside está compuesta de 120 moléculas de VP2 arregladas en forma de 60 dímeros, 12 copias de VP1 que es la RNA polimerasa dependiente de RNA y 12 copias de VP3 que funciona como guanililtransferasa y metiltransferasa, todas estas proteínas envuelven el dsRNA genómico (Fig. 1 panel C y D) (McClain, Settembre et al. 2010). En el núcleo de la partícula viral se encuentra el genoma de RV, que está compuesto por 11 segmentos de dsRNA, que codifican para 12 proteínas, de las cuales 6 son estructurales (VP) y 6 son no estructurales (NSP1-6) (Estes and Cohen 1989; Jayaram, Estes et al. 2004) (Fig. 1 panel A).



**Figura 2. Ciclo de replicación**

El ciclo de infección de RV inicia con la unión del virus a la célula huésped, esta unión se da por el reconocimiento dinámico de receptores en la membrana plasmática (1); posteriormente RV entra a la célula en un proceso mediado por endocitosis y posteriormente entra al citoplasma, en este proceso la partícula viral pierde la capa externa de la cápside (2-3); una vez que el virión pierde la cápside externa queda una DLP, esta partícula es transcripcionalmente activa y da lugar a la primera ronda de transcripción (4); los mRNAs virales son reconocidos por la maquinaria de traducción celular, dando lugar a la síntesis de proteínas virales (5); cuando los niveles de proteínas llegan a una masa crítica, estos se aglomeran dando lugar a los viroplasmos (6) en donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral (7) y el ensamblaje de nuevas DLPs (7-8). Las DLPs recién formadas tienen 2 funciones, la primera es dar lugar a una segunda ronda de transcripción y de traducción (9), y la segunda función de las DLPs es la formación de nuevas TLPs, proceso que se lleva en el lumen del RE para finalizar con la formación de la partícula viral (10-12). Finalmente, las partículas virales recién formadas son liberadas mediante lisis (13-14). Imagen tomada de Ruiz et al, 2009.

### **Ciclo de replicación**

El ciclo de replicación de RV comienza con la unión de la partícula viral a receptores específicos en la superficie de la célula huésped, posteriormente el virus se internaliza en

la célula mediante un proceso que depende de interacciones secuenciales con varios ligandos, así como de una serie de cambios conformacionales en las proteínas de la cápside (Fig. 2 #1) (Arias, Isa et al. 2002). Hasta ahora el mecanismo de entrada de RV a la célula no está bien caracterizado, sin embargo se ha propuesto la endocitosis y la entrada directa como posibles mecanismos (Knipe 2006). Una vez dentro de la célula, RV pierde la capa externa de la cápside (a este proceso se le conoce como desnudamiento) en un proceso dependiente de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (Fig. 2, #2-3). Las DLPs resultantes son transcripcionalmente activas y llevan a cabo la primera ronda de transcripción viral (transcripción primaria) en la que se sintetizan los mRNAs virales que funcionan como mensajeros para dirigir la síntesis de proteínas virales (Fig. 2 #4-5); cuando se acumula una masa crítica de proteínas virales, éstas se agregan dando lugar a inclusiones citoplásmicas llamadas viroplasmos, en donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral y el ensamble de más DLPs, las cuales inician una nueva ronda de transcripción (transcripción secundaria) (Fig. 2, #5-9) (Knipe 2006). Las DLPs a su vez geman hacia el lumen del RE en donde se lleva a cabo su maduración (Fig. 2, #10-12) (Maruri-Avidal, Lopez et al. 2008), es decir, adquieren la cápside externa. Se ha propuesto que en células CaCo-2 la interacción de VP4 con balsas lipídicas durante etapas tardías de la infección provoca una remodelación del citoesqueleto, lo que llevaría a la desestabilización de la membrana celular y finalmente a la liberación de la progenie viral mediante la lisis de la célula huésped (Fig. 2, #13-14) (Knipe 2006).

## **Transcripción viral**

Como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de entrada de RV la capa externa de la cápside se remueve, resultando en una DLP, esta partícula posee todas las actividades enzimáticas necesarias para la síntesis de mRNA viral al igual que para guanilar y metilar al CAP en el extremo 5' terminal de los mensajeros virales (revisado en Pesavento, Crawford et al. 2006). Las funciones enzimáticas son llevadas a cabo por las proteínas VP1, que funciona como RNA polimerasa RNA dependiente y la proteína VP3, que tiene la actividad de guanililtransferasa y metiltransferasa.

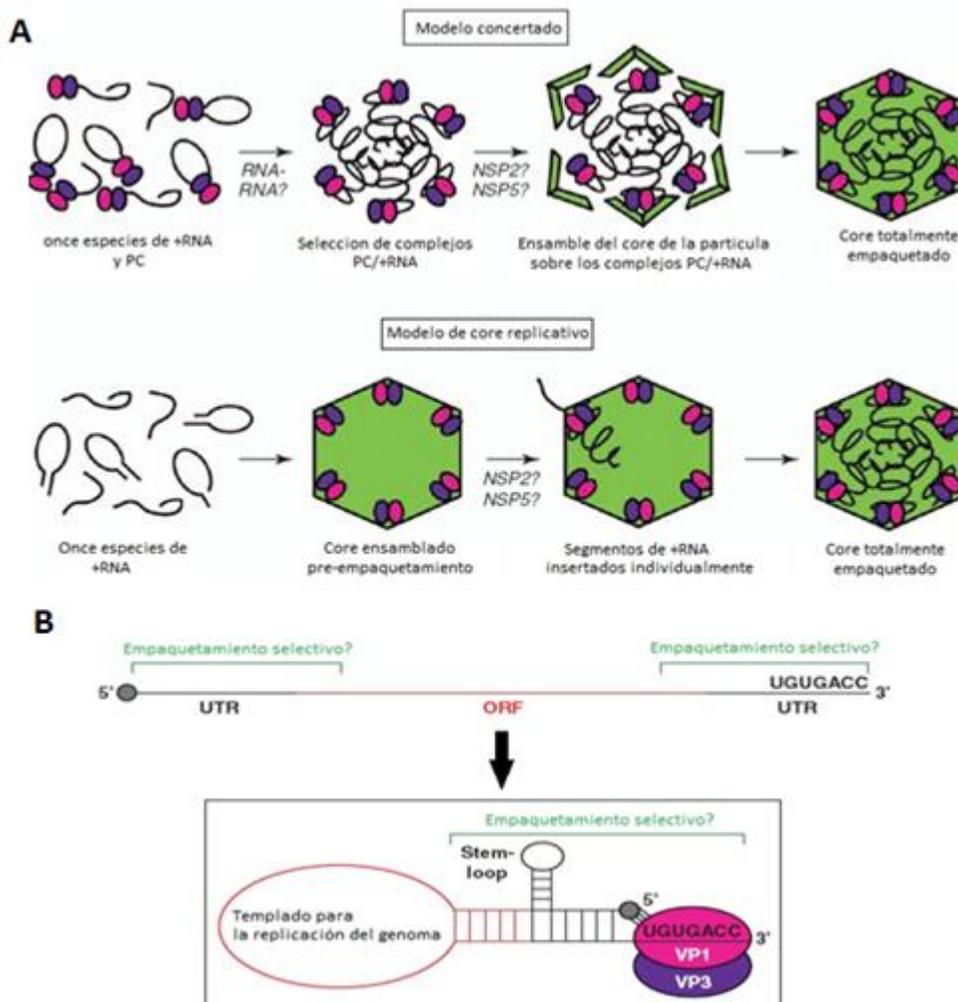
La cápside de RV presenta ciertas características que le permiten realizar el proceso de transcripción sin necesidad de desensamblar su cápside por completo ni exponer el dsRNA genómico en el citoplasma, lo cual al inicio de la infección sería contraproducente para el ciclo replicativo del virus ya que el reconocimiento del dsRNA llevaría a la activación de la respuesta inmune. Una de estas características distintivas de la estructura de las DLPs es la presencia de 132 canales que atraviesan las dos capas proteicas lo que comunica al medio externo con el “core” de la partícula. En base a su posición y tamaño, estos canales se han agrupado en 3 tipos; los canales tipo 1 se encuentran en los 12 ejes de 5 vértices, los canales tipo 2 se encuentran en los ejes de seis vértices que rodean a los de 5 vértices; mientras que los canales tipo 3 se encuentran también en ejes de 6 vértices pero adyacentes a ejes de 3 vértices (McClain, Settembre et al. 2010). Aunque no se ha comprobado, se cree que los canales tipo 2 y tipo 3 son responsables de la importación de metabolitos requeridos para la síntesis de RNA, mientras que los canales tipo 1 se encuentran posicionados por encima de la maquinaria de replicación y de transcripción lo que provee un conducto hacia las proteínas VP1 y VP3 en el “core” interno, las cuales se encargan de la síntesis y el “capping” de los RNA mensajeros respectivamente. Así mismo, mediante técnicas de crio-microscopía y mapas de densidad electrónica se ha encontrado que el dsRNA genómico se encuentra de manera ordenada dentro del core de la partícula, además de que existe evidencia que sugiere que cada segmento de dsRNA forma una estructura de espiral que interactúa con una molécula de VP1 y VP3 en cada uno de los vértices del core (Prasad, Rothnagel et al. 1996; Lawton, Estes et al. 1997).

Uno de los aspectos más interesantes de la transcripción de RV es el requerimiento de la proteína de cápside VP6, ya que se ha demostrado experimentalmente que al remover esta proteína se producen partículas sin la actividad de transcriptasa (Mansell and Patton 1990; Sandino, Jashes et al. 1986), y esta actividad puede ser recuperada parcialmente al incubar los cores con VP6 (Sandino, Jashes et al. 1986). Sin embargo, ha sido difícil estudiar la naturaleza de la contribución de VP6 durante la transcripción debido a que no tiene sitios de unión a RNA y a su falta de actividad enzimática, aunque se ha especulado

que VP6 podría ser necesaria para la salida del mRNA de la DLP y/o para el transporte de nucleótidos trifosfato (por sus siglas en inglés NTPs) hacia la maquinaria de síntesis. La VP1 desempeña el papel de transcriptasa y replicasa viral, VP6 parece ser necesaria para el proceso de transcripción, pero no para el proceso de replicación del genoma viral, en contraste, la proteína de cápside interna VP2 es necesaria para ambos procesos (Mansell and Patton 1990). Recientemente se ha observado que el extremo amino terminal (los residuos 1-80) de VP2 forma lo que se denomina como “centro de actividad”, justamente en los ejes de 5 vértices. Este centro de actividad está formado por proyecciones hacia el core de la partícula de cinco N-terminales de VP2 en la conformación A y cinco en la conformación B, los cuales son esenciales para reclutar a VP1 y VP3 durante el ensamble de la partícula. Este centro de actividad forma un canal que puede ser importante para la formación del core de la partícula, como un carrete que el dsRNA puede utilizar para adquirir su conformación helicoidal dentro de la partícula, estabilizándolo y finalmente para guiar la extrusión del mRNA naciente (McClain, Settembre et al. 2010). Por el contrario las proteínas de cápside externa parecen tener un efecto negativo en la transcripción. Cuando se trata de hacer transcripción *in vitro* con TLPs, se llegan a sintetizar pequeños RNAs de 10 o 12 nucleótidos, los cuales quedan retenidos en la partícula viral; esto parece ser un indicativo de que las proteínas de cápside externa, VP4 y VP7, presentan un impedimento para la salida del mRNA naciente (revisado en Patton, Vasquez-Del Carpio et al. 2004).

Por otra parte, estudios de cristalografía de alta resolución han revelado que la VP1 es proteína globular compuesta por tres dominios; el dominio amino terminal, el dominio de polimerasa y el dominio carboxilo terminal. El dominio de polimerasa conserva los subdominios “palm, finger y thumb” (palma, dedo y pulgar) característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA (Ogden, Ramanathan et al. 2011), y también incluye los aminoácidos necesarios para la coordinación del ion  $Mg^{2+}$  involucrado en la interacción con NTPs. Otra característica importante de la transcripción de RV es que se lleva a cabo de manera conservativa, en la cual la cadena recién sintetizada es expulsada del virión

hacia el citoplasma mientras el RNA parental es mantenido dentro de las DLPs. Aún no es claro cómo es que una DLP puede reiniciar la transcripción, sin embargo se tiene evidencia de que la RNA polimerasa se une a los dos extremos de los segmentos de dsRNA por lo que se piensa que esto podría darle continuidad al proceso, de manera que se forma un intermediario circular, por lo que la maquinaria de transcripción puede “reciclar” al RNA parental para una nueva búsqueda del sitio de inicio, aún después de haber terminado de sintetizar un transcrito (revisado en Patton, Vasquez-Del Carpio et al. 2004).



**Figura 3.- Replicación y empaquetamiento del genoma viral**

**A)** Representación esquemática de las 2 hipótesis de replicación y ensamble del genoma. **B)** Esquema de un mRNA viral en el que se indican los sitios UTR's que son importantes para el reconocimiento selectivo durante el empaquetamiento y el sitio conservado UGUGACC en el extremo 3', el cual tiene interacción con el complejo de polimerasa (PC) viral, lo cual lleva a una posible circularización del mensajero y a su posterior replicación. Tomado de McDonald and Patton 2011.

## Replicación, empaquetamiento y ensamble viral

Para los virus con genoma segmentado el empaquetamiento de cada uno de los fragmentos de información genética es un paso crítico para la formación de progenie infectiva. Algunos virus de RNA simplemente empaquetan su genoma de manera no selectiva, por lo que se forman una gran cantidad de partículas sin el genoma completo (Luque, Saugar et al. 2009). Generalmente los virus que contienen un genoma de más de dos segmentos han desarrollado sofisticados mecanismos en los que utilizan señales en *cis* para asegurar el empaquetamiento de cada uno de los segmentos del genoma en la partícula viral recién formada.

Como se ha mencionado antes, el genoma de RV consta de 11 segmentos de dsRNA por lo que para asegurarse del empaquetamiento de todo el genoma evoluciono un mecanismo en el que los procesos de replicación, empaquetamiento, así como los primeros pasos del ensamble de la partícula viral son eventos coordinados. Una de las grandes preguntas que aún quedan por responder es cómo se reconocen cada uno de los segmentos. Existen dos hipótesis que tratan de dar una explicación de cómo se dan estos procesos; la primera hipótesis propone que el reconocimiento del material genético se da antes del empaquetamiento; similar a lo que influenza A (Hutchinson, von Kirchbach et al. 2010), esta hipótesis comienza con la asociación de mRNA con el complejo de polimerasa viral, posteriormente se lleva a cabo la “selección” (assortment) de cada uno de los segmentos mediante el reconocimiento entre UTR presentes en cada uno de los mRNA virales, una vez que la selección de los segmentos esta lista, VP2 interacciona con VP1 y VP3 permitiendo el empaquetamiento del genoma y ya empaquetado se replica cada uno de los segmentos en el interior de la partícula (Fig. 3 panel A arriba); la segunda hipótesis propone que el empaquetamiento del genoma viral es posterior al ensamblaje de la partícula, tal y como lo hace el fago  $\Phi 6$  (Mindich 2004). El ensamblaje comienza con la interacción de las proteínas VP1, VP2 y VP3, lo que lleva a la formación de una SLP vacía, la cual posteriormente interactúa con hebras de polaridad positiva de cada uno de los 11

distintos segmentos de mRNA viral, los cuales se internalizan durante la replicación del genoma (Fig. 3 panel A abajo) (McDonald and Patton 2011).

Cada uno de los transcritos de RV contiene secuencias importantes, así como elementos estructurales que promueven: a) el reconocimiento de ribosomas, b) reconocimiento para el empaquetamiento (assortment) y por último c) la replicación (Fig. 3 panel B) (revisado en McDonald and Patton 2011). Los transcritos de RV varían en tamaño entre 0.7 y 3.1 kb (Li, Manktelow et al. 2010). Prácticamente todos los segmentos tienen sólo un marco de lectura (por sus siglas en inglés ORF), el cual está flanqueado por dos regiones no traducidas (por sus siglas en inglés, UTR). Las cepas de RV pertenecientes al grupo A contienen en su 3'UTR una secuencia conservada de 7 nucleótidos; UGUGACC (Fig. 3 panel B) (Li, Manktelow et al. 2010). Esta pequeña secuencia aparentemente tiene una gran importancia tanto en los RNAs localizados en el citoplasma como en los que se encuentran en viroplasmos. En el caso de los mensajeros virales localizados en citoplasma esta secuencia es importante para el reconocimiento de la proteína no estructural NSP3, sin embargo aún no se tiene clara la función de esta interacción, aunque en el laboratorio pensamos que esta interacción puede ser importante para determinar la localización de mensajeros dentro de la célula. Por otra parte, esta secuencia en los mensajeros virales que serán replicados es utilizada por la maquinaria de replicación viral (VP1 y VP3) (revisado en McDonald and Patton 2011; Tortorici, Broering et al. 2003), para el reconocimiento de cada segmento en el viroplasma. Esta unión, presumiblemente permite la incorporación del material genético al core de la partícula. Se cree que la unión de VP1 con el 3'UTR del mensajero viral da lugar en primera instancia a un complejo estable pero aún catalíticamente inactivo, y así permanece hasta el momento en que VP2 se une a este complejo lo que activa el proceso de inicio de la replicación del genoma viral, utilizando a esta misma secuencia como promotor mínimo para este proceso. Se ha observado la formación de un loop en el RNA al unirse a la maquinaria de traducción, los modelos computacionales predicen la formación de un loop en el RNA de tal manera que se circulariza dejando una cola de cadena sencilla en el 3'UTR la cual sirve para la unión de

la polimerasa viral necesaria para la replicación (Fig. 3 panel B) (Li, Manktelow et al. 2010). Por otro lado, estudios de la secuencia de cada segmento del genoma de RV han mostrado que los UTRs no comparten homología entre los 11 segmentos, sin embargo, al comparar el mismo segmento de distintas cepas se observa gran identidad a nivel nucleotídico, por lo que también se cree que la estructura terciaria de cada segmento así como sus respectivos UTRs podrían tener un papel importante para el empaquetamiento selectivo del genoma viral (Li, Manktelow et al. 2010).

Otras proteínas que están implicadas en la replicación de RV son las proteínas formadoras de viroplasma NSP2 y NSP5. NSP2 forma octámeros que tienen una gran afinidad al ssRNA, así como actividad de NTPasa (Schuck, Taraporewala et al. 2001). Estas funciones no son necesarias para la formación de viroplasma, sin embargo, se cree que la unión de esta proteína a ssRNA podría ayudar a la eliminación de estructuras secundarias durante el empaquetamiento del genoma, y por otra parte, la actividad de NTPasa de NSP2 y su presencia en intermediarios de replicación son evidencia de que esta proteína podría funcionar como un motor molecular para la inserción del RNA viral a cores armados. Por otro lado, la función de NSP5 en replicación aún no es del todo clara, al igual que NSP2, NSP5 tiene sitios de unión a ssRNA (Vende, Taraporewala et al. 2002); análisis bioquímicos han comprobado que existen interacciones tanto de NSP2 como de NSP5 con VP1 y VP2 (Arnoldi, Campagna et al. 2007), por lo que se piensa que la función de NSP5 podría ser el reclutamiento y la retención de estructuras “pre-core” en los viroplasma.

## **Virus y Endocitosis**

La endocitosis es un proceso activo de la célula en el cual están involucrados un gran número de moléculas encargadas de orquestar cambios en la estructura y algunas veces en la composición de la membrana con el fin de promover la internalización de metabolitos a la célula. Durante los primeros pasos de la endocitosis se dan procesos físicos de deformación de membrana los cuales dictan el mecanismo de endocitosis, así, la escala de estas primeras invaginaciones es un primer rasgo para clasificar este proceso. La

ingestión de partículas mayores a 500 nm típicamente ocurre a través de macropinocitosis o fagocitosis, mientras que moléculas más pequeñas pueden entrar por medio de endocitosis dependiente de clatrina, dependiente de caveolina, o por vías aún no bien caracterizadas independientes de clatrina y caveolina. Sin embargo, este proceso también es regularmente aprovechado por patógenos para lograr internalizarse a la célula, o para insertar toxinas al citoplasma celular, ya que utilizar este medio le confiere ciertas ventajas, tales como ser transportados hacia algún organelo al que requieran entrar para realizar su función, en algunos casos proteasas promueven la desencapsidación de ciertos virus, o incluso el pH ligeramente ácido en endosomas tardíos puede ser aprovechado por algunos parásitos para cumplir ciertas funciones dentro de su ciclo infectivo. En la actualidad se ha sabe que los virus pueden utilizar cada una de las vías endocíticas descritas para transportarse al interior de la célula (revisado en Ghigo 2010) (Tabla1).

<b>Virus</b>	<b>Vía de entrada</b>
<b>APMV</b>	Fagocitosis
<b>Adenovirus 2/5</b> <b>Influenza</b>	Endocitosis mediada por clatrina
<b>Adenovirus 3</b> <b>HIV1</b> <b>Vaccinia virus</b>	Macropinocitosis
<b>Ebola virus</b> <b>SV40</b>	Endocitosis mediada por caveolina

**Tabla 1.- Virus y Endositosis** La entrada de los virus a la célula es un proceso crítico para su propagación, debido a esto los virus han desarrollado formas de aprovechar los procesos endocíticos celulares. En esta tabla se mencionan algunos virus que utilizan cada una de estas vías para su internalización.

### **Endocitosis mediada por clatrina**

De las vías endocíticas, la endocitosis mediada por clatrina o CME (por sus siglas en inglés, Clathrin Mediated Endocytosis) es la vía mejor descrita y al parecer la más usada por los virus (Marsh and Helenius 2006), como resultado de la CME se obtienen vesículas CCV (por sus siglas en inglés, Clathrin Coated Vesicles) las cuales miden aproximadamente 120 nm de diámetro, las CCV se forman mediante un proceso de 4 pasos; primero se forma una pequeña invaginación de la membrana producida por la unión de las primeras moléculas de clatrina con la membrana citoplásmica, por el reclutamiento de proteínas adaptadoras y accesorias; el segundo paso es la maduración de la vesícula, el cual requiere de actina; el tercer paso es la escisión de la vesícula de la membrana en un proceso dependiente de dinamina; y en el último paso la vesícula recién formada pierde la capa de clatrina y comienza la fusión de la CCV con el endosoma temprano (Takei and Haucke 2001; Conner and Schmid 2003).

### **Endocitosis mediada por caveola.**

La endocitosis mediada por caveolina es un proceso poco comprendido, el cual actúa como su nombre lo dice vía caveolina para la internalización de ligandos extracelulares y componentes de membrana entre otros. La caveolina es una proteína de 21 kDa que es transportada al Golgi en donde se oligomeriza y se asocia con colesterol y sitios ricos en glicosfingolípidos, los cuales forman a las caveolas, las caveolas son invaginaciones de 50 a 80 nm de diámetro en forma de frasco presentes en las membranas (Parton and Simons 2007). La endocitosis caveolar es estimulada por ligandos que llevan a la formación de pequeñas vesículas que se fusionan ya sea con endosomas tempranos o con caveosomas (Parton and Simons 2007; Pelkmans and Helenius 2002).

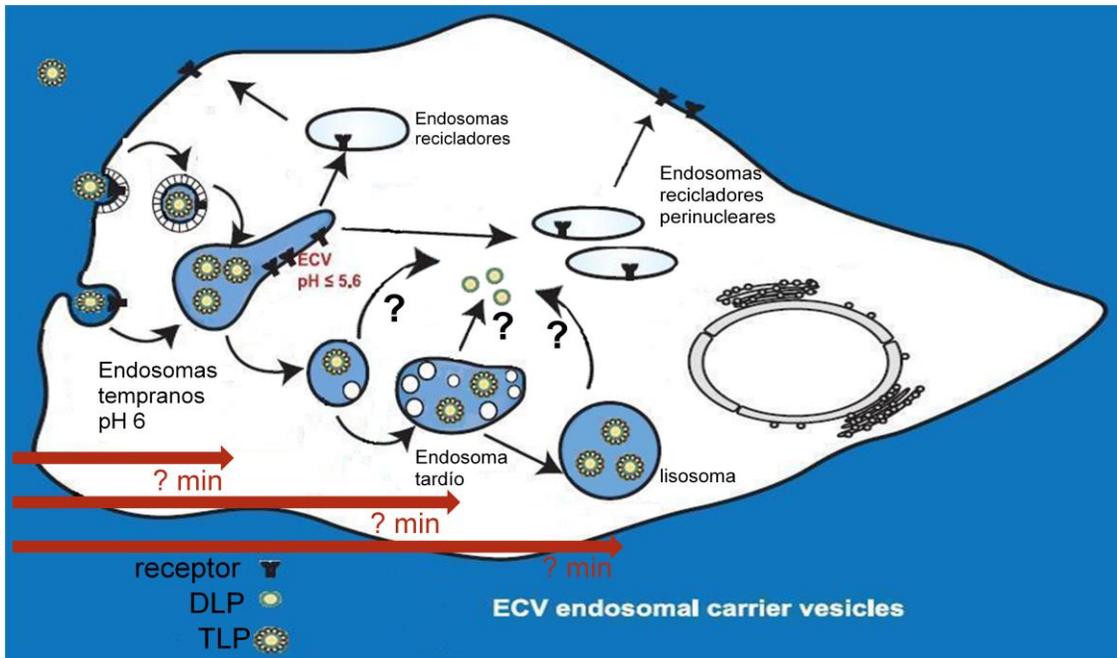
### **Macropinocitosis**

La macropinocitosis es un proceso usado por la célula para internalizar una gran cantidad de macromoléculas y fluidos a su interior y ocurre por estimulación de factores de crecimiento, interleucina-4 y ésteres de forbol (Ghigo 2010). La macropinocitosis está

implicada en procesos tales como migración celular, presentación de antígeno, sobrevivencia y cascadas de señales (Conner and Schmid 2003). Esta vía endocítica es independiente tanto de receptores, como de dinamina y por otro lado es un proceso dependiente de rearrreglos del citoesqueleto de actina, así como de las Rho GTPasa y de la PI3K (Sieczkarski and Whittaker 2002; Swanson and Watts 1995). Como producto de la macropinositosis se forman los llamados macropinosomas cuya principal característica es su gran tamaño y la presencia de la proteína rabakirina-5 (Schnatwinkel, Christoforidis et al. 2004).

### **Fagocitosis**

La fagocitosis es un proceso por el cual las células ingestan partículas mayores a 0.5  $\mu\text{m}$ . En general es un mecanismo por el que se fagocitan y destruyen patógenos tales como bacterias y hongos; sólo es llevado a cabo por células especializadas tales como macrófagos, monocitos, células dendríticas y neutrófilos. Al contrario de la macropinocitosis, la fagocitosis comienza después de la activación de los llamados receptores de reconocimiento de patrones lo cual lleva a la internalización de la partícula/microorganismo por un mecanismo dependiente de actina (Underhill and Ozinsky 2002). Hasta la fecha, se han detectado numerosas moléculas que participan en este tipo de endocitosis tales como proteínas de unión a actina, reguladores de tráfico de membrana, cinasas, lipasas y lípidos. Una vez que la vesícula se internaliza se le llama fagosoma el cual puede llevar a cabo fusiones con diferentes endosomas. Un aspecto interesante de esta vía fagocítica es que durante su maduración comparte algunos de los marcadores de la endocitosis clásica como Rab5 y EEA1 en el fagosoma temprano, Rab7 que es un marcador de un fagosoma maduro. Por último la maduración del fagosoma tardío es denominada fagolisosoma y es en este estadio en el que se lleva a cabo la lisis de los patógenos atrapados en esta vesícula (Haas 2007).



**Figura 4. Mecanismo de entrada de RV**

La entrada de RV comienza cuando la partícula viral reconoce a su receptor en la membrana plasmática de la célula huésped, posteriormente el virus es internalizado a la célula a través de un proceso endocítico aún no bien caracterizado, la vesícula recién internalizada es llevada a endosomas tempranos. Receptores y algunas proteínas de membrana son reciclados a la membrana plasmática mientras las partículas rotavirales y algunas moléculas recién endocitadas son transportadas por vesículas acarreadoras que madurarán para dar lugar al endosoma tardío que finalmente se fusiona con el lisosoma para la degradación de las partículas recién endocitadas. La fase del tráfico vesicular en la que se da la salida de RV hacia el citoplasma es aún desconocido.

### **Entrada de rotavirus**

La entrada de los virus no envueltos a la célula es un proceso poco comprendido. Sabemos que las primeras interacciones de los RV con su célula huésped son un proceso coordinado y de múltiples pasos, que involucran interacciones secuenciales con varios receptores celulares e involucra una serie de cambios conformacionales en las proteínas de la cápside. Para algunas cepas de RV se piensa que la interacción inicial de VP8 con ácido siálico puede inducir cambios en VP5 que permiten su interacción con integrina  $\alpha 2\beta 1$  (revisado en Isa, Arias et al. 2006). El mecanismo por el cual los RV ingresan a la célula aún no es claro, sin embargo se sabe que la entrada es dependiente de procesos activos.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que el mecanismo de entrada puede variar entre diferentes cepas de RV. Así, se ha mostrado que RRV (cepa de simio) entra mediante un proceso independiente de clatrina y caveolina, mientras que UK (cepa bovina) entra mediante un proceso dependiente de clatrina. No obstante el origen de la vesícula endocítica que utilizan las cepas de RV para entrar a la célula, aparentemente el proceso de entrada converge en la unión de la vesícula recién internalizada con el endosoma temprano, el cual tiene un pH aproximado a 6 (Mayor and Pagano 2007). Una vez que el endosoma temprano es formado, éste da lugar a vesículas que tienen varios posibles destinos; pueden ser recicladas hacia la membrana celular llevando receptores y proteínas de membrana, o también desprender vesículas acarreadoras endosomales las cuales pueden formar vesículas perinucleares o pueden dar lugar al endosoma tardío (pH  $\leq 5.6$ ), los cuales se fusionarán finalmente con lisosomas en donde se digieren las moléculas cargo que se encuentren en esta estructura (Mayor and Pagano 2007) (Fig. 4). Una vez que RV entra a la ruta endosomal se desconoce en qué etapa del tráfico vesicular el virus “escapa” hacia el citoplasma de la célula huésped (Fig. 4) (Scita and Di Fiore 2010). Se ha propuesto que cuando la partícula viral es internalizada a la célula, en el interior de una vesícula de origen endosomal se lleva a cabo el proceso de desnudamiento por un mecanismo dependiente de la disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intravesicular (revisado en Ruiz, Cohen et al. 2000). Hasta hace un par de años no se tenía ninguna pista de que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  bajara durante la ruta endosomal, sin embargo recientemente se han caracterizado 2 canales que se encargan de sacar  $\text{Ca}^{2+}$  de endosomas, los TPCs (Two Pore Channel) y un “TRP-like channel” (Transient Receptor Potential-Like  $\text{Ca}^{2+}$ ) llamado canal de calcio endosomal (por sus siglas en inglés ECC) (Saito, Hanson et al. 2007; Galione, Evans et al. 2009). La existencia de estos canales apoyan la hipótesis del desnudamiento dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e incluso, alguno de estos dos canales podría ser el responsable del desnudamiento de la partícula viral. Una vez que RV lleva a cabo el proceso de desnudamiento se liberan las proteínas de la capa externa (VP7, VP5 y VP8) y se ha propuesto que la interacción de estas proteínas con la membrana del endosoma lleva a la desestabilización de la vesícula, a su lisis y a la consecuente liberación

de la partícula viral al citoplasma (Knipe 2006). Como producto del desnudamiento viral queda una DLP. Se sabe que esta partícula es la responsable de la primera ronda de transcripción, sin embargo, se desconoce el sitio preciso de la célula, así como el tiempo de infección, en el que este proceso comienza (Patton, Vasquez-Del Carpio et al. 2004).

## **Hipótesis**

La caracterización del inicio de la transcripción nos permitirá localizar el punto en la vía en la que el virus entra al citoplasma celular.

## **Objetivos**

- Determinar el sitio y el momento en el que el virus se libera del endosoma y entra en contacto con el citoplasma celular y se lleva a cabo el desnudamiento y la transcripción viral.
- Caracterizar las consecuencias del uso de tratamientos que inhiben ciertos pasos de la entrada de RV sobre su desnudamiento y transcripciónRV.
- Caracterizar el sitio intracelular donde se encuentran las proteínas virales, las partículas y los RNA mensajeros y genómicos virales, durante el ciclo de infección.

## **Metodología**

### **Cultivo celular**

Se trabajó con la línea celular MA104 (epitelial de riñón de mono verde), la cual fue cultivada en medio mínimo esencial Eagle (MEM). Las cepa de RV utilizada en este trabajo fue el Rhesus RV (RRV).

### **Infección**

Células MA104 fueron cultivadas en medio MEM con suero al 4% a 37°C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente se lavaron con MEM sin suero y se dejaron reposando por aproximadamente 30min a 37°C. Las células en MEM/sin suero fueron infectadas con el virus RRV (previamente tratado con tripsina a una concentración de 10µg/ml a 37°C por 30min). Para la adsorción se dejó incubando el virus 1hr a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, sobre las células y posteriormente se lavaron con MEM/sin suero y según el tiempo de infección deseado se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **FISH**

Para los ensayos de FISH (del inglés “Fluorescent in situ hybridization”), las células MA104 fueron cultivadas en placas de 48 pozos sobre portaobjetos de 10mm hasta que alcanzaron la confluencia, posteriormente se infectaron con la cepa RRV a distintos tiempos de infección. y fueron fijadas con paraformaldehído al 3% por 20min a temperatura ambiente, seguido por 3 lavados en PBS-NH<sub>4</sub>Cl 50mM, posteriormente se permeabilizaron con Tritón al 0.5% en PBS con NH<sub>4</sub>Cl 50mM por 15min a temperatura ambiente, se lavaron y fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.5% PBS + NH<sub>4</sub>Cl 50mM, se lavaron nuevamente y se dejaron incubando con buffer de hibridación (twen20 0.1%, cloruro de sodio 0.75M y citrato de sodio 0.075M) al 50% formamida a 58°C en presencia de la sonda (marcada con UTP-digoxigenina) a una concentración de 1ng/pozo durante toda la noche

(hasta este momento todos los lavados fueron hechos con PBS  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM). Posteriormente las células se lavaron 3 veces con buffer de hibridación 50% formamida a  $70^\circ\text{C}$  y 2 veces con buffer SSC (cloruro de sodio 0.75M y citrato de sodio 0.075M) a  $70^\circ\text{C}$ . En los casos en los que se necesitaba realizar también una inmunofluorescencia, las células se bloquearon con buffer de bloqueo (el cual consta de BSA al 1%, leche al 0.2%, TritonX100 al 0.3% en PBS) por 1hr a temperatura ambiente, después se dejaron incubando con el anticuerpo primario (anti-DIG-peroxidasa (1:1000) anti- NSP5 (1:1000)) por 1hr se lavaron con PBS  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM y se dejaron incubando por otra hora con el anticuerpo secundario. Finalmente las células fueron lavadas con buffer TNT (Tris pH7.5 0.1M, cloruro de sodio 0.15M, tween20 0.0125% en PBS) y se agregó el fluoróforo (cianina 3) a una dilución 1/100 para el reconocimiento de la sonda por 8min, las células fueron lavadas nuevamente con buffer TNT en agitación (si se necesita teñir núcleo se utiliza DAPI 1/1000000 y se lava nuevamente con buffer TNT) y se montaron los cubreobjetos con medio de montar Fluokeep (Argen). La señal de fluorescencia para la detección de RNA fue obtenida mediante el sistema de amplificación de señal tiramida utilizando el kit "TSA-plus TMR/fluorescein system" (Perkin Elmer LAS, Inc.) el cual se utilizó de acuerdo al protocolo recomendado por la compañía (TSA). Por último las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 acoplado a una cámara digital DXM1200.

## **Inmunofluorescencia**

Células MA104 fueron cultivadas en placas de 48 o 96 pozos, sobre portaobjetos de 10mm o 5mm, respectivamente, hasta confluencia, posteriormente se infectaron con RV RRV durante el tiempo indicado y se fijaron con paraformaldehído al 3% durante 20min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS- $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM y se permeabilizaron con Tritón al 0.5% en PBS  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM por 20 min seguido por otro lavado, posteriormente se realizó el bloqueo con buffer de bloqueo (el cual consta de BSA al 1%, leche al 0.2%, TritonX100 al 0.3% en PBS) por 1hr a temperatura ambiente y se incubó el anticuerpo primario, o con faloidina por 1 hora, se lavan las células y se incuban con el anticuerpo

secundario por 1hr, posteriormente se lavaron las células con buffer TNT y se tiñó el núcleo con DAPI 1/1000000 y se lavó nuevamente con buffer TNT, finalmente los cubreobjetos se montaron con medio Fluokeep (Argene). Por último las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 acoplado a una cámara digital DXM1200.

### Lista de anticuerpos utilizados

Nombre	Origen, tipo de anticuerpo	Dirigido contra	Fuente
<b>3A8</b>	Ratón, Monoclonal	VP2	H.B.Greenberg
<b>HS2</b>	Ratón, Monoclonal	VP4	H.B.Greenberg
<b>αTLP's</b>	Conejo, Policlonal	Capside de Rotavirus.	Producido en el laboratorio
<b>αNSP5</b>	Conejo, Policlonal	NSP5	Producido en el laboratorio
<b>αNSP2</b>	Conejo, Policlonal	NSP2	Producido en el laboratorio
<b>αNSP3</b>	Conejo, Policlonal	NSP3	Producido en el laboratorio
<b>αNSP4</b>	Conejo, Policlonal	NSP4	Producido en el laboratorio
<b>αDIG</b>	Oveja, Fab-Peroxidasa	Digoxigenina	Molecular Probes(Eugene,OR)
<b>Alexa -523</b>	Cabra, policlonal	IgG conejo, IgG raton	
<b>Alexa-488</b>	Cabra, Policlonal conjugado a Alexa-488	IgG de ratón/conejo	Molecular Probes(Eugene,OR)
<b>Alexa-647</b>	Alexa-647	conejo	Molecular Probes(Eugene,OR)
<b>α-Conejo-PO</b>	Acoplado a peroxidasa	IgG Conejo	(Boston. MA)
<b>αRatón-PO</b>	Acoplado a peroxidasa	IgG Ratón	Zymed (San Francisco, CA)

### Tratamiento con inhibidores

El tratamiento de las células con los distintos inhibidores se hizo utilizando las siguientes concentraciones.

Citocalasina D partiendo de un stock a una concentración de 10000 μM diluida en DMSO, se utilizó a una concentración final de 10μM diluida en MEM sin suero.

Nocodazol stock a una concentración de 10000 μM diluida en DMSO, se utilizó a una concentración final de 10μM diluida en MEM sin suero.

Células MA104 fueron crecidas a confluencia y según sea el caso se infectaron o no con RRV. Para ambas drogas los tiempos de tratamiento variaron de entre 30min a 6 horas según se especifique para cada experimento, así como también se utilizaron tiempos de reposo posterior al retiro de la droga de 30min a 5hr, según el experimento. Para las condiciones de células infectadas posterior a la hora de adsorción se trataron con EGTA para eliminar el virus que ha sido internalizado a este tiempo seguido por dos lavados con MEM sin suero.

### **Crecimiento de bacterias, extracción de plásmido y purificación de DNA plasmídico**

Se crecieron bacterias E. coli en medio LB /ampicilina 100µg/ml en agitación a 37°C. Para la extracción del plásmido se utilizó el kit “high pure plasmid isolation kit” (Roche), se utilizó de acuerdo al protocolo recomendado por la compañía.

### **Transcripción *in vitro***

Para la transcripción *in vitro* se utilizó el kit “mMESSAGE mMACHINE” (Ambion) de acuerdo al protocolo recomendado. A manera de resumen, a partir de 2 µg del plásmido PGem3Z-NSP4 (linearizado previamente con EcoR1) se mezcló con 2µl de ATP, 2µl de CTP, 2µl de GTP 1.3µl de UTP y 0.7µl de UTP-Digoxigenina, 2 µl del buffer de reacción 10X, 2 µl de la mezcla enzimática de la T7 RNA polimerasa y el volumen necesario de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 20 µl; la mezcla se incubó a 37°C de 2 a 4 horas. Posteriormente, se agregó 1 µl de DNAsa a la mezcla anterior y se incubó de nueva cuenta por 15 min a 37 °C. El RNA sintetizado en el paso anterior se precipitó adicionando una mezcla de 30µl de agua DEPC y 30µl de una solución de LiCl incluida en el kit, a -20 °C durante 30min y se centrifugó la muestra a 4°C por 15 min a máxima velocidad para precipitar el RNA. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, el precipitado se lavó

dos veces con 1 ml de etanol al 70%. El RNA precipitado se resuspendió en 12µl de agua DEPC, se cuantificó y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

### **Fraccionamiento con Digitonina**

Para el fraccionamiento de las células con digitonina se utilizó el protocolo descrito por Bernardi (Bernardi, Forster et al. 2008), células MA104 se infectaron o no y posteriormente se lavaron y despegaron utilizando 5ml de una solución de EDTA (0.2%). Las células se colectaron en un tubo y se centrifugaron por 5min a 1000rpm y se lavaron 3 veces con buffer HCN (50mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM N-ethyl maleimide (NEM)). Las células se resuspendieron en buffer HCN con 0.02% digitonina (aproximadamente 100µl por cada 2x10<sup>7</sup> células), y se incubaron en hielo por 10min, posteriormente se centrifugaron a 16000 X g y finalmente se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y el pellet se resuspendió en un volumen igual al original de buffer HCN.

### **PCR**

A partir de un aislado de RNA celular se utilizó el kit “ONESTEP RT-PCR KIT”(Quiagen) de acuerdo al protocolo del fabricante; se preparó la solución “onestep mix” la cual consta 22µl de agua DEPC, 10µl RT buffer, 10µl Q buffer, 2µl dNTP's 12.5mM y 2µl de enzyme mix. Por otro lado se preparó una solución llamada “oligo mix” la cual lleva 4µl RNA viral, 1µl de los oligos 3' y 5' del segmento 10 de RV, ésta solución se dejó en baño maria (aproximadamente 100°C) por 5 minutos y colocada en hielo inmediatamente después. Finalmente se mezclaron 2.5µl “oligo mix” y 10µl “onestepmix”, esta mezcla se colocó en el termociclador y se siguieron las siguientes condiciones: 30 min a 50°C, posteriormente 15 min a 95° C, 40 ciclos de 30seg a 94°C seguidos por 30seg a 50°C y 60 segundos a 72°C, finalmente un último ciclo de 10 min a 72°C

## PCR en tiempo real, (qRT-PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando el software 7500 System SDS software 1.2.1 (Applied Biosystems). Para cada una de las placas se realizó una curva estándar utilizando distintas concentraciones de RNA viral sintetizado *in vitro* (VP6), esta curva patrón se utiliza para calcular la concentración del RNA de la muestra para cada caso. Dado que el genoma de RV es de RNA de doble cadena (dsRNA), el amplificar el RNA viral utilizando al mismo tiempo un par de oligos no nos permitiría distinguir las cantidades de RNA+ y RNA- (ya que tienen la misma secuencia sólo que complementaria). Por lo tanto, para cuantificar cada tipo de RNA viral de forma específica, el RNA se amplificó en dos pasos: En el primer paso, se realizó una reacción de transcriptasa reversa utilizando el oligo complementario a la cadena que se deseaba cuantificar, usando la siguiente mezcla de reacción: 10µl de SYBR green Master Mix (Applied Biosystems), 0.1µl de transcriptasa reversa 50U/µl (Applied Biosystems), 0.16µl Inhibidor de RNAsas 40U/µl (Promega), 1µl de oligo a 1.5pmol/µl, 2µl de RNA (1 ng; resuspendido en agua, y tratado en baño maria por 5 minutos e inmediatamente enfriado en hielo), 20µl agua c.b.p. La reacción se llevó a cabo a 48° C durante 30 minutos y, posterior a esto, las muestras se incubaron a 85° C por 15 min e inmediatamente se enfriaron en hielo, con el fin de inactivar a la transcriptasa reversa. El siguiente paso consistió en la amplificación del cDNA recién sintetizado, mediante PCR. Para ello, 1µl del oligo complementario (2.5 pmol/µl) se agregó a la mezcla de reacción para un volumen final de 25µl. La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo 7500 Real Time PCR System utilizando el siguiente protocolo: 95° C por 10 minutos y 40 ciclos de 95° C por 15 segundos y 60° C durante 1 minuto. Para confirmar la especificidad de la amplificación, se agregó una etapa de disociación de 60° a 95° C durante 30 min. Finalmente, se determinó el Ct de cada muestra, se comparó con la curva estándar y se calculó la concentración de RNA utilizando el software 7500 system SDS detection. El gen utilizado para hacer el qPCR fue el de VP6 utilizando el siguiente juego de oligos; (5' > 3') CCACTTGGTATCCGACTTTGA y (5' > 3') GAATACGTGGACGCATCCTT

## **Marcaje Radioactivo y autoradiografías**

Células MA104 se crecieron en frascos de 75mm<sup>3</sup> y se infectaron con RRV como se describió con anterioridad. Para cada condición, las proteínas sintetizadas de novo fueron marcadas radiactivamente durante 1 hora antes de cosecharlas utilizando MEM sin metionina suplementado con 25 µCi/ml de Easy Tag EXPRESS-<sup>35</sup>S labeling mix (Dupont-NEN).

Las muestras se corrieron en un gel de SDS PAGE al 10%, el gel se seco al vacío en un papel filtro y se dejó exponiendo en con un Film fotográfico a -70°C durante aproximadamente una semana.

## **Western blot**

Las células fueron despegadas utilizando EDTA (0.2%), se fraccionaron mediante digitonina y posteriormente las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles SDS PAGE al 10%, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Estas membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en PBS, incubándolas durante una hora a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario indicado diluido en PBS con 1% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C y con el anticuerpo secundario correspondiente (acoplados a peroxidasa o a los fluoróforos Alexa 488 ó 647) durante una hora a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa fue revelada mediante el Kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal producida por los anticuerpos fluorescentes fue visualizada en un Typhoon Trio (Amersham), la intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el software ImageJ, para el procesamiento de los datos en todos los casos se normalizaron los datos con respecto al gen correspondiente de un lisado total a las 8hpi.

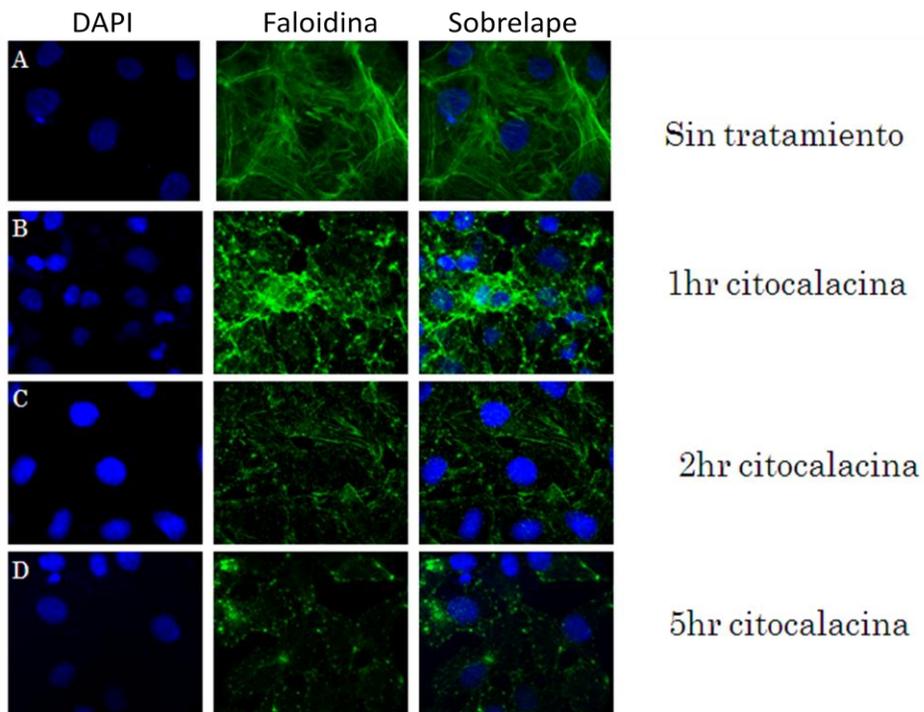
## **Resultados**

### **Papel de citoesqueleto en la entrada de RV**

En estudios recientes del laboratorio se ha determinado que el citoesqueleto aparentemente no participa en los primeros pasos de entrada de RV, como son el reconocimiento con el receptor y el comienzo de la formación de la vesícula endocítica, pero aún no se ha podido determinar si las etapas tardías de la formación y el transporte de la vesícula al interior de la célula son importantes para la entrada de RV. Para abordar esta pregunta utilizamos drogas que inhiben la polimerización de actina o tubulina, éstas son Citocalasina D y nocodazol respectivamente y utilizamos marcadores de viroplasma para determinar su efecto sobre la infección.

### **Actina**

Para diseñar un protocolo que nos permitiera determinar si la actina desempeña un papel durante la entrada, lo primero que hicimos fue determinar cuál es el tiempo mínimo que se necesita para que la Citocalasina D ejerza su efecto máximo. Para esto se trataron células MA104 con Citocalasina 10 $\mu$ M por 30min, 1hr, 2hr, 3hr, 4hr y 5hr, se utilizó como control células tratadas sólo con DMSO a la dilución apropiada. Posteriormente, las células se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia utilizando faloidina para teñir el citoesqueleto de actina y DAPI para teñir los núcleos. Las imágenes muestran que el efecto es específico de la droga, ya que se observan los microfilamentos en un estado normal en células tratadas sólo con DMSO (Fig. 5 panel A); por otra parte, el marcaje del citoesqueleto de actina disminuyó a los 30 minutos de tratamiento con la droga lo que indica que a este tiempo la Citocalasina ya tiene un efecto visible (dato no mostrado), finalmente la droga alcanza su efecto máximo a partir de 1 hora de tratamiento (Fig. 5 panel B). Tratamientos más prolongados con la droga comienzan a dañar la morfología celular y aumentar la muerte celular (Fig. 5 paneles C y D). Con estos datos podemos concluir que 1hr de tratamiento con la droga es suficiente para obtener su efecto máximo sin alterar gravemente la forma por lo que creemos que las actividades celulares quedan intactas.

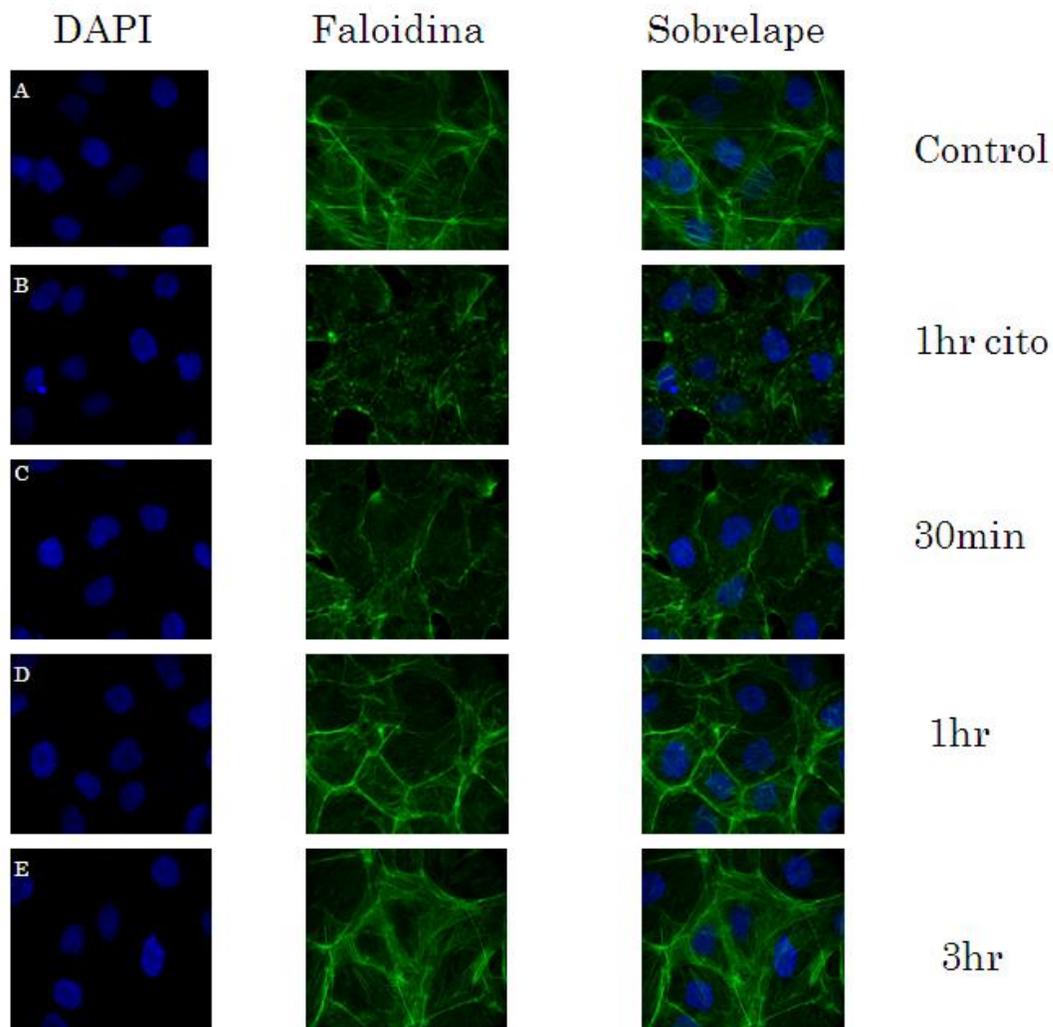


**Figura 5. Determinación del tiempo en que Citocalasina D ejerce su máxima inhibición**

Células MA104 fueron tratadas con Citocalasina D por 30min, 1hr (**B**), 2hr (**C**), 5hr (**D**) y como control se utilizaron células sin tratamiento con la droga (**A**), en todas las condiciones las células fueron fijadas y se tiñó actina con faloidina 488 (verde) y el núcleo con DAPI (azul).

Una vez determinado el tiempo en que la Citocalasina alcanza su efecto máximo nos preguntamos si el efecto de esta droga es reversible y si lo es cuánto tiempo dura su efecto una vez que ha sido retirada del medio. Para esto las células fueron tratadas durante 1 hora con Citocalasina D, se lavaron y se dejaron reposar durante 30min, 1hr, 2hr y 3hr utilizando como control células tratadas con DMSO; finalmente las células fueron fijadas y se tiñeron con faloidina y DAPI. Las células control que no fueron tratadas con la droga presentan un citoesqueleto de actina intacto (Fig. 6, panel A), en contraste, en las células tratadas con Citocalasina D por una hora, sin dejar tiempo de recuperación se observa el efecto máximo del tratamiento (Fig. 6, panel B). Por otra parte, las células que se dejaron recuperar por 30min, no presentaron una recuperación aparente de los efectos

de la droga (Fig. 6, panel C), sin embargo, se observa una recuperación de los efectos de la Citocalasina D en las células que se dejaron reposar por 1 hora posterior al tratamiento con la droga (Fig. 6, panel D) y se recuperaron totalmente después de 3hr de reposo. Por lo que pudimos establecer que después de 1 hora de descanso del tratamiento con Citocalasina D, se alcanza la recuperación total del citoesqueleto de actina en células MA104 (Fig. 6).

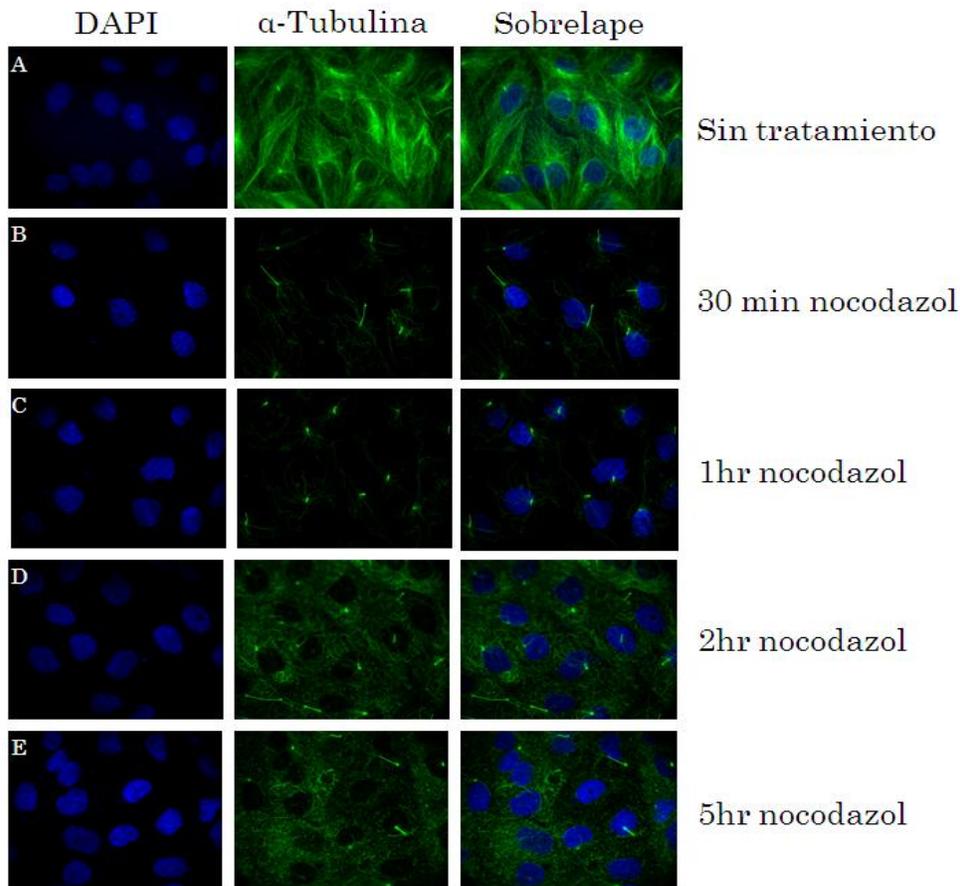


**Figura 6. Duración del efecto de Citocalasina D en células MA 104**

Las células fueron tratadas con Citocalasina D por 1 hora, posteriormente las células fueron lavadas y se dejaron reposar por 30min (C) 1hr (D), 3hr (E) y como control se utilizaron células sin tratamiento (A). Como referencia en el panel B se muestra el efecto que tiene la Citocalasina en las células después de 1hr de tratamiento. En verde se muestra el citoesqueleto marcado con faloidina488 y en azul se muestra el marcaje del núcleo con DAPI.

## **Tubulina**

De la misma manera que para la Citocalasina D, con el fin de diseñar un protocolo que nos permitiera determinar si el citoesqueleto de tubulina desempeña un papel durante la entrada, se determinó el tiempo mínimo que se necesita para que el nocodazol tenga su efecto máximo sobre la polimerización de tubulina. Para esto se trataron células MA104 con nocodazol a una concentración de 10 $\mu$ M por 30min, 1hr, 2hr, 3hr, 4hr y 5hr, y como control se utilizaron células tratadas sólo con DMSO. Las células se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia utilizando  $\alpha$ -tubulina para teñir microtúbulos y DAPI para teñir los núcleos. Las imágenes muestran que el DMSO no tiene ningún efecto sobre los microtúbulos ya que se observan en un estado normal en células tratadas sólo con DMSO (Fig. 7, panel A), sin embargo, el citoesqueleto de tubulina se ve seriamente afectado después de 30 minutos de tratamiento con la droga (Fig. 7, panel B). Finalmente la droga alcanzó su efecto máximo a partir de 1 hora de tratamiento (Fig. 7, panel C) el efecto de la droga aumenta conforme al tiempo de exposición al nocodazol (Fig. 7, paneles D y E), sin embargo, consideramos que el efecto observado a una hora de exposición a la droga permite inhibir la polimerización de tubulina lo suficiente para realizar nuestros experimentos sin tener los efectos secundarios que podría causar una exposición mayor a ésta, por lo que utilizamos este tiempo de exposición en experimentos posteriores.

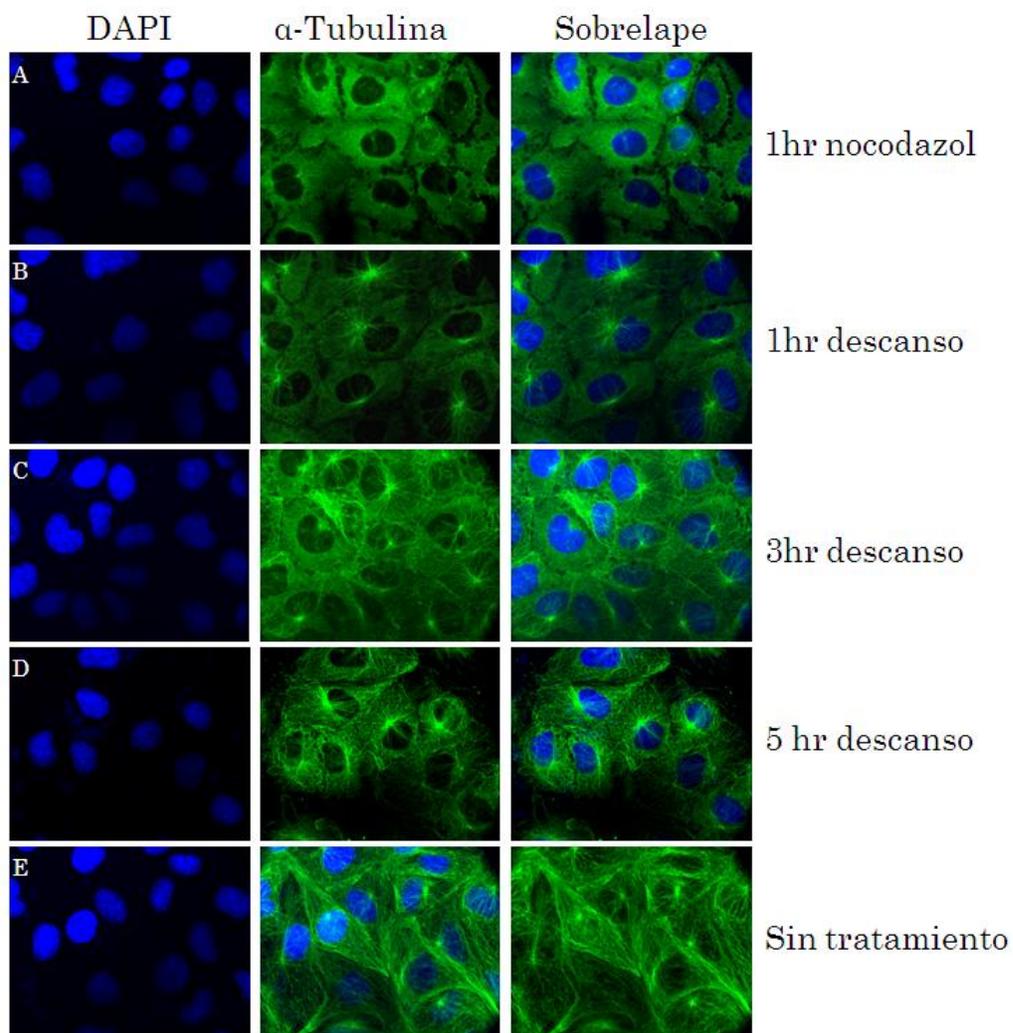


**Figura 7. Determinación del tiempo en el que el nocodazol alcanza su efecto máximo**

Células MA104 fueron tratadas con nocodazol por 30min (B), 1hr (C), 2hr (D) y 5hr (E) y como control se utilizaron células sin tratamiento con la droga (A), en todas las condiciones la células fueron fijadas y se tiñó la tubulina con  $\alpha$ -tubulina (verde) y el núcleo con DAPI (azul).

Una vez determinado el tiempo en que el nocodazol tiene su efecto, determinamos cuánto tiempo dura el efecto de esta droga una vez que ha sido retirada del medio. Para esto las células fueron tratadas durante 1 hora con nocodazol a una concentración de  $10\mu\text{M}$ , posteriormente se lavó la droga de las células y se dejaron reposar durante 30min, 1hr, 2hr, 3hr, 4hr y 5hr, utilizamos células tratadas sólo con DMSO como control, después se fijaron las células y se tiñeron con  $\alpha$ -tubulina y DAPI. Tal y como se esperaba, en las células que no fueron tratadas con la droga no se observó un efecto aparente del DMSO sobre los microtúbulos (Fig. 8, panel E), mientras que en las células tratadas por 1 hora con nocodazol se observó el efecto de éste sobre el citoesqueleto de tubulina (Fig. 8,

panel A) por otro lado, las células que se dejaron descansar del efecto de la droga no mostraron una recuperación total del citoesqueleto de tubulina en los tiempos observados, sin embargo, si se logró observar que conforme aumenta el tiempo de recuperación de las células hay un incremento en el grado de recuperación sobre la polimerización de tubulina (Fig. 8 paneles B, C y D).



**Figura 8. Duración del efecto del nocodazol sobre los microtúbulos**

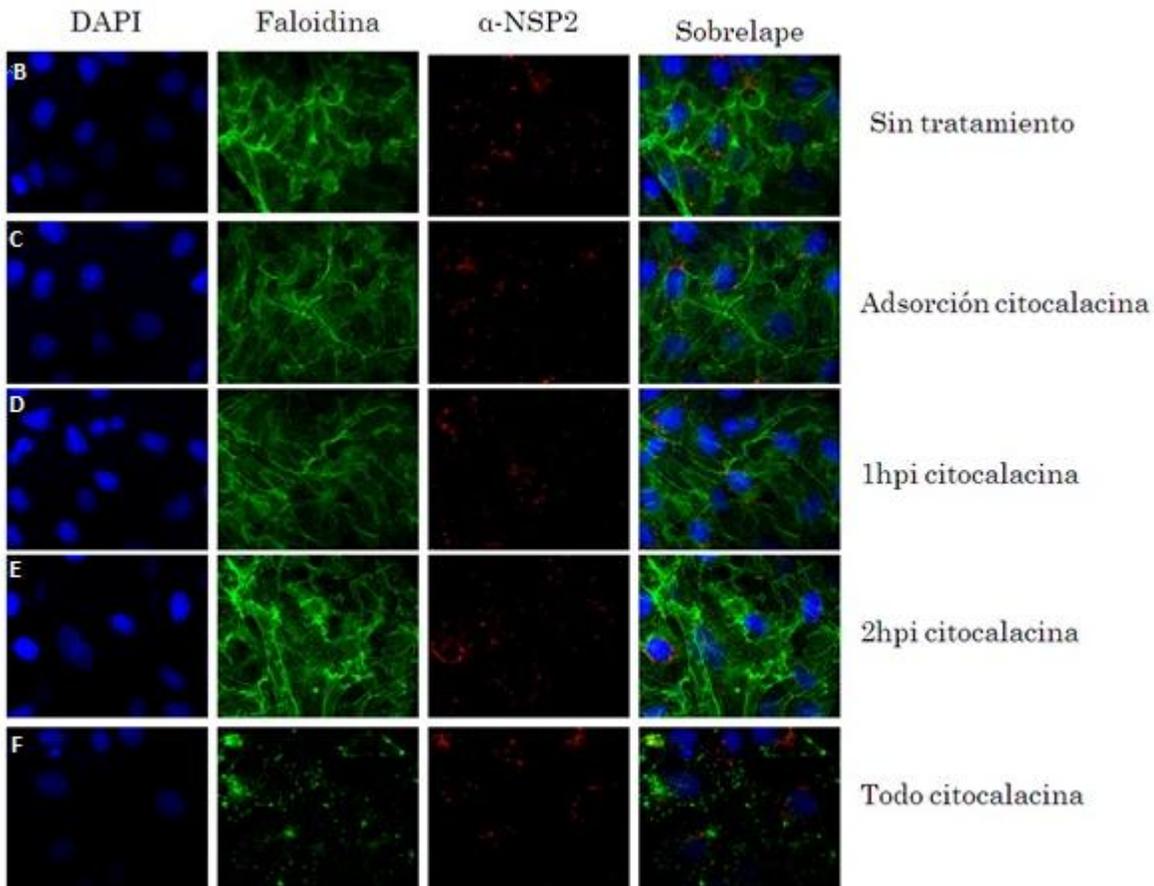
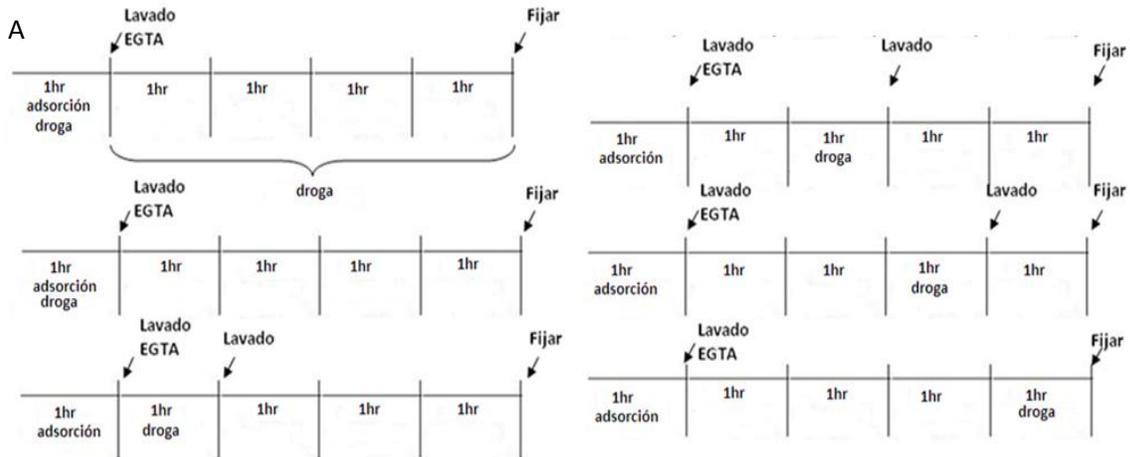
Las células fueron tratadas con nocodazol por 1 hora, posteriormente las células fueron lavadas y se dejaron reposar por 30min, 1hr (B), 2hr, 3hr (C), 5hr (D) y como control se utilizaron células sin tratamiento (E). Como referencia en el panel (A) se muestra el efecto que tiene el nocodazol después de 1 hora de tratamiento.

## **Papel del citoesqueleto de actina en la entrada de RV**

Para determinar el papel de los filamentos de actina durante la entrada de RRV, células infectadas fueron tratadas con Citocalasina D utilizando las siguientes condiciones; para determinar el efecto máximo de la droga durante las primeras horas de infección de RV se trataron células con Citocalasina D desde la adsorción hasta las 4hpi (Fig. 9); por otra parte también se realizaron una serie de condiciones en las que las células fueron tratadas con pulsos de 1hr de Citocalasina, estos pulsos se realizaron durante la adsorción, a 1, 2, 3 y 4hpi (panel A de la figura 9)

En caso de que la actina tuviera un papel en la entrada se observaría el efecto de la citocalasina D solamente en las condiciones de tratamiento a horas tempranas (adsorción 1 y 2hpi) mientras que en las etapas más tardías del tratamiento no observaríamos ningún tipo de efecto (3hpi y 4hpi). Como control para cada caso se utilizaron células tratadas con DMSO (Fig. 9 panel A). En todos los casos las células fueron lavadas con EGTA después de la adsorción para eliminar a las partículas virales que no han entrado a la célula y finalmente las células fueron fijadas a las 4hpi para posteriormente realizar un ensayo de inmunofluorescencia marcando microfilamentos con faloidina, núcleo con DAPI y viroplasmos como marcador de infección utilizando un anticuerpo contra la proteína no estructural NSP2 ( $\alpha$ -NSP2).

Las células tratadas a 1hpi no mostraron cambios significativos ni en número de células infectadas, en tamaño, forma o distribución de viroplasmos en el citoplasma celular (Fig. 9 paneles B, C y D). De la misma manera las células que fueron sometidas a la droga durante las 5 hrs del experimento no mostraron ningún cambio significativo en el grado de infección, tamaño, forma o distribución de los viroplasmos, aún cuando las células ya se observan muy dañadas por la exposición a la droga al compararlas con las células control (Fig. 9 panel E). Estos datos en conjunto muestran que la entrada de RV a la célula no depende del citoesqueleto de actina.



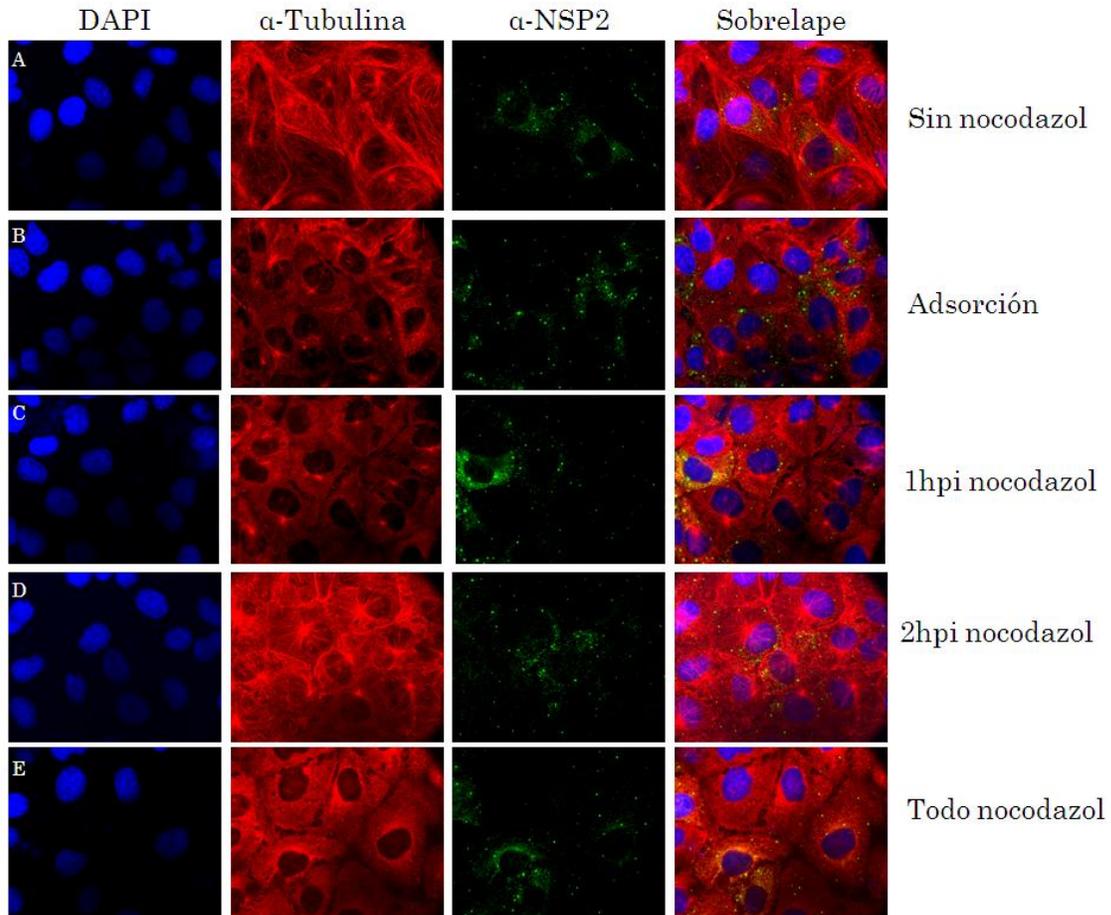
**Figura 9. Determinación del papel de los microfilamentos en la entrada de RV**

**A)** Representación esquemática del protocolo utilizado para cada una de las condiciones de tratamiento con la droga. Células MA104 fueron infectadas y tratadas con Citocalasina durante los tiempos indicados durante la infección; **(B)** condición control de células infectadas por 4hr sin tratamiento con Citocalasina D, en donde se observa el citoesqueleto de actina polimerizado (verde), de manera consistente a lo reportado para esta hora de infección se observa la formación de viroplasmias (rojo). **(C)** células tratadas con

Citocalasina durante la hora de adsorción **(D)** células tratadas con Citocalasina durante la 1hr de infección, **(E)** células tratadas con la droga durante la 2hr de infección y **(F)** son células tratadas con Citocalasina desde la adsorción hasta la 4hr de infección, al comparar los viroplasma de las células que fueron tratadas con Citocalasina durante pulsos cortos con las células control no se observa ningún cambio en el grado de infección de RV (comparar panel B con C, D y E).

## **Papel del citoesqueleto de tubulina en la entrada de RV**

En estudios anteriores se ha mostrado que la proteína viral NSP2 tiene una interacción directa con tubulina. También se ha observado que el citoesqueleto de tubulina es necesario para el crecimiento de los viroplasma durante el ciclo de infección de RV (Cabral-Romero and Padilla-Noriega 2006). Por otra parte, aún no se ha determinado si el citoesqueleto de tubulina participa en la entrada de RV a la célula. Para abordar esta pregunta, se trataron células con nocodazol utilizando un protocolo igual al descrito previamente para la Citocalasina D (Fig. 10 panel A). En este caso las células también fueron fijadas a las 4hpi y posteriormente se marcaron los microtúbulos con  $\alpha$ -tubulina, el núcleo con DAPI y los viroplasma con  $\alpha$ -NSP2. Como control se utilizaron células tratadas solamente con DMSO en las que no se observó ningún cambio en los microtúbulos, y también se muestran células control solamente infectadas con RV (Fig. 10 panel A). Sorprendentemente no encontramos cambios aparentes en el número, tamaño o forma de los viroplasma para ninguna de las condiciones utilizadas en este experimento (Fig. 10 paneles B, C, D y E), a pesar de que se observara que los microtúbulos están afectados por el tratamiento con nocodazol. Este resultado sugiere que el citoesqueleto de tubulina no participa durante la entrada de RV.



**Figura 10. Determinación del papel de los microtúbulos en la entrada de RV**

Células MA104 fueron infectadas y tratadas con nocodazol durante distintos tiempos de infección de RRV **(A)** condición control de células infectadas por 4hr sin tratamiento de nocodazol, en donde se observa el citoesqueleto de tubulina polimerizado (rojo), de manera consistente a lo reportado para esta hora de infección se observa la formación de viroplasmos (verde). **(B)** células tratadas con nocodazol durante la hora de adsorción **(C)** células tratadas con nocodazol durante la 1hr de infección, **(D)** células tratadas con la droga durante la 2hr de infección y **(E)** son células tratadas con nocodazol desde la adsorción hasta la 4hr de infección,

### **Detección organelo-citoplasma de proteínas virales**

Aunque se tiene un conocimiento general sobre la localización de las proteínas, las partículas y el RNA viral a lo largo del ciclo de infección, aún no hay una caracterización global en la que se relacione la localización de cada una de éstas a lo largo del ciclo de infección. Por lo que decidimos abordar este tema aprovechando la capacidad de enriquecer por un lado una fase citosólica y por otro lado una fase de organelos y

membranas mediante un fraccionamiento con un detergente débil llamado digitonina. El tratamiento con este detergente provoca la formación de poros en la membrana citoplásmica de las células, de tal manera que el citoplasma celular junto con las proteínas solubles saldrán al medio (sobrenadante) al someterlos a una fuerza centrifuga, mientras que en el pellet esperamos obtener proteínas de organelos, proteínas de membrana y complejos citoplásmicos grandes que no puedan salir después de la centrifugación (Bernardi, Forster et al. 2008).

Para demostrar que el fraccionamiento celular funcionó de manera adecuada realizamos una cinética de 0 a 4 hpi donde determinamos por inmunohistoquímica la distribución de HSC70, como proteína marcadora de citoplasma y de PDI como proteína marcadora de organelos. Tal como se esperaba y confirmando un fraccionamiento adecuado la proteína HSC70 y PDI se encontraron mayoritariamente en la fracción del sobrenadante y pellet, respectivamente (Fig. 11), independientemente del tiempo post infección. Estos datos indican que este procedimiento nos permite separar una fracción enriquecida de proteínas citoplásmicas solubles y una fracción insoluble que contiene mayoritariamente proteínas de organelares.



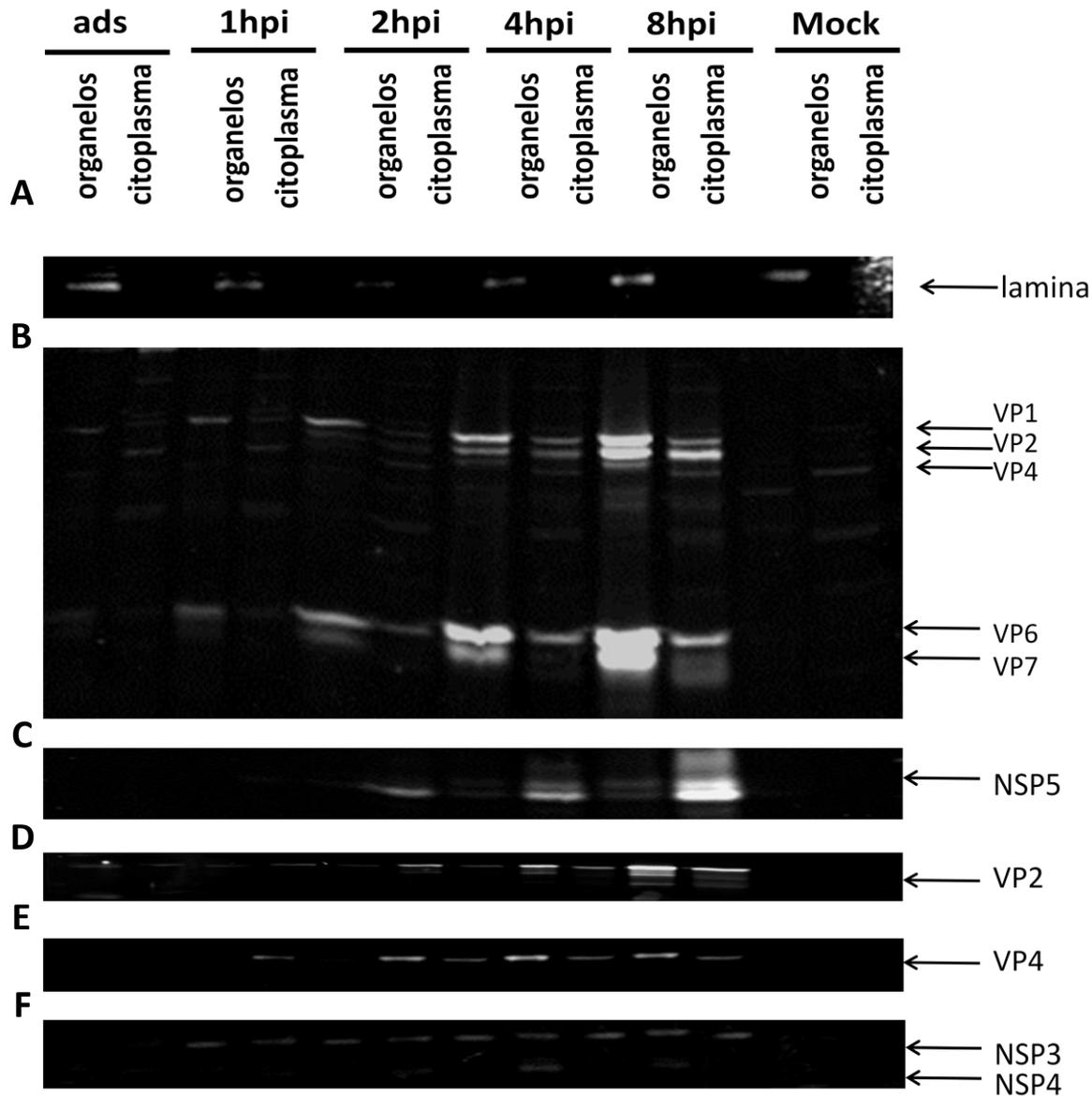
**Figura 11. Fraccionamiento de células durante las primeras horas de infección**

Células MA104 fueron infectadas con RRV, posteriormente se realizó un fraccionamiento utilizando estas condiciones; adsorción, 1hpi, 2hpi, 3hpi y 4hpi. Posteriormente se realizó un WB utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -HSC70 y  $\alpha$ -PDI en el que se observó que en el sobrenadante se quedan las proteínas citoplásmicas (HSC70) mientras que en el pellet hay una mayor concentración de proteínas procedentes de organelos (PDI).

Posteriormente, como otra manera de corroborar que el fraccionamiento efectivamente separa una fracción rica en proteínas de organelos y membrana (pellet) de una fracción rica en proteínas citoplásmicas (sobrenadante), realizamos un WB para detectar Laminina. Esta proteína nuclear sólo se encontró en la fracción no soluble (Fig. 12, panel A). Una vez que comprobamos que podemos separar las fracciones deseadas mediante el tratamiento con digitonina, determinamos la localización organelo-citoplasma de las proteínas virales, comenzando por buscar la localización de las proteínas de cápside de RV durante las primeras 8hpi en estas dos fracciones. Para esto realizamos un WB utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -TLPs (Fig. 12, panel B). Con este anticuerpo logramos observar las proteínas de cápside viral a partir de la 1hpi en la fracción de organelos mientras que en la fracción citoplásmica no logramos observar proteína viral hasta las 4hpi. De la misma manera se puede observar que en cada una de las condiciones utilizadas las proteínas de cápside viral se encuentran en su mayoría en la fracción enriquecida por membranas y organelos celulares. Debido a que no logramos detectar proteína de cápside viral en el periodo de adsorción nos indica que no logramos tener la sensibilidad suficiente para detectar proteína de las partículas virales que están siendo internalizadas a la célula. Por otra parte, el observar una mayor concentración de proteína viral en la fracción enriquecida por membranas y organelos celulares hasta las 8hpi, sugiere que las proteínas de cápside viral podrían encontrarse principalmente dentro de algún compartimento celular o ancladas directa o indirectamente a alguna membrana. Estas suposiciones requieren de estudios subsecuentes. Existen reportes en la literatura en los que se han reportado interacciones entre tubulina y proteínas integrales de viroplasma (NSP2 y NSP5) (Cabral-Romero and Padilla-Noriega 2006). Por otro lado, recientemente se ha descrito que estructuras de membrana llamadas "lipid droplets" son necesarias para la formación de viroplasma (Cheung, Gill et al. 2010). Debido a estas interacciones con la membrana y la red de microtúbulos pensamos que durante el fraccionamiento, los viroplasma podrían quedar atrapados en el pellet, ya que hemos encontrado a las proteínas de cápside viral en mayor concentración en la fracción no soluble. Nos preguntamos si esto es debido a que estas proteínas se encuentran enriquecidas en los viroplasma, lugar en donde se

lleva a cabo la formación de DLPs, por lo que buscamos proteínas marcadoras de viroplasma en ambas fracciones por medio de WB para detectar NSP5. Sorprendentemente encontramos esta proteína enriquecida en la fracción citoplásmica (Fig. 12 panel C). Estos datos sugieren que los viroplasma podrían ser estructuras citoplásmicas o fácilmente “solubles” y muestran que la mayoría de las proteínas de cápside viral no co-fraccionan con viroplasma por lo que probablemente no se encuentran dentro de estas estructuras o su asociación a estas es muy débil.

Otras dos proteínas importantes durante la infección de RV son NSP3 y NSP4, aunque ahora sabemos que NSP3 no es necesaria para la síntesis de proteínas virales, parece que tiene un papel en la regulación de la traducción celular por RV ya que al silenciar la expresión de esta proteína aumenta la traducción de mensajeros celulares (Montero, Arias et al. 2006). Por otra parte, NSP4 es una proteína de membrana y fue la primera enterotoxina viral descrita, también está implicada en el ensamblaje de la partícula viral funcionando como un receptor intracelular de VP6 para la gemación de las DLPs hacia el lumen del RE (Ball, Mitchell et al. 2005), así como en la desregulación de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  celular a través de su dominio de vioporina (Hyser, Collinson-Pautz et al. 2010). Para determinar la fracción en donde se encuentran estas 2 proteínas realizamos un WB utilizando anticuerpos específicos para cada una de estas proteínas (Fig. 12, panel F), en el cual observamos que la concentración de NSP3 es la misma para las dos fracciones hasta las 8hpi, mientras que como lo esperábamos la proteína NSP4 sólo se encuentra en la fracción no soluble ya que es una proteína integral de membrana de RE.



**Figura 12. Localización de proteínas virales por medio de WB**

**A)** WB contra la proteína nuclear lamina, la cual sólo se encuentra en la fracción no soluble **B)** WB utilizando  $\alpha$ -TLPs en el que se marcan las proteínas de cápside viral en los distintos fraccionamientos obtenidos con el ensayo de digitonina. **C)** WB con anticuerpos  $\alpha$ -NSP5, se observa esta proteína sólo en la fracción soluble. **D)** y **E)** WB para detectar a las proteínas de cápside VP2 y VP4, de manera congruente a lo observado en el panel B) observamos una mayor concentración de estas proteínas en el pellet, por lo que confirmamos con dos anticuerpos distintos la observación de que las proteínas estructurales están enriquecidas en la fracción no soluble. **F)** detección de NSP3 y NSP4 mediante WB en donde observamos la distribución organelos citoplasma de NSP3 es prácticamente 1:1 mientras que en el caso de NSP4 sólo se encuentra en la fracción no soluble.

Una vez que determinamos la presencia de proteína viral mediante ensayos de WB, nos preguntamos si en algún momento de la infección hay cambios en la expresión y/o distribución de las proteínas virales en las fracciones aisladas, por lo que cuantificamos la síntesis de *nov* de proteínas en células infectadas y no infectadas, fraccionadas mediante digitonina a 4, 8, y 12hpi, marcando con metionina radioactiva durante los últimos 30 minutos antes de cosechar, en este mismo experimento como control negativo utilizamos células no infectadas, por otro lado, como control positivo y para ver el patrón normal de proteínas de RV utilizamos un lisado total no fraccionado a las 8hpi.

Como es de esperarse en las células no infectadas observamos sólo proteínas celulares y una baja concentración de proteína viral (Fig. 13, Panel A). En células infectadas a partir de las 4 hpi se puede observar el aumento en la concentración de proteínas virales mientras que la concentración de proteínas celulares disminuye con el tiempo de infección, así mismo también podemos observar que la distribución organelo-citoplasma de proteínas virales no cambia con el tiempo, con excepción de VP4, NSP2 y NSP3 (Fig. 13).

Además, al medir la concentración de proteínas totales mediante WB, también observamos que la concentración de proteínas de cápside viral sintetizada *de novo* durante la infección es mayor en la fracción de organelos y membranas. Cabe recalcar que sólo encontramos a VP7 en la fase organelar del fraccionamiento; este dato es congruente con lo reportado en la literatura ya que esta es una proteína que se sintetiza y se retiene en el RE, lugar en donde se termina el ensamble de RV (Fig. 13 panel A y B).

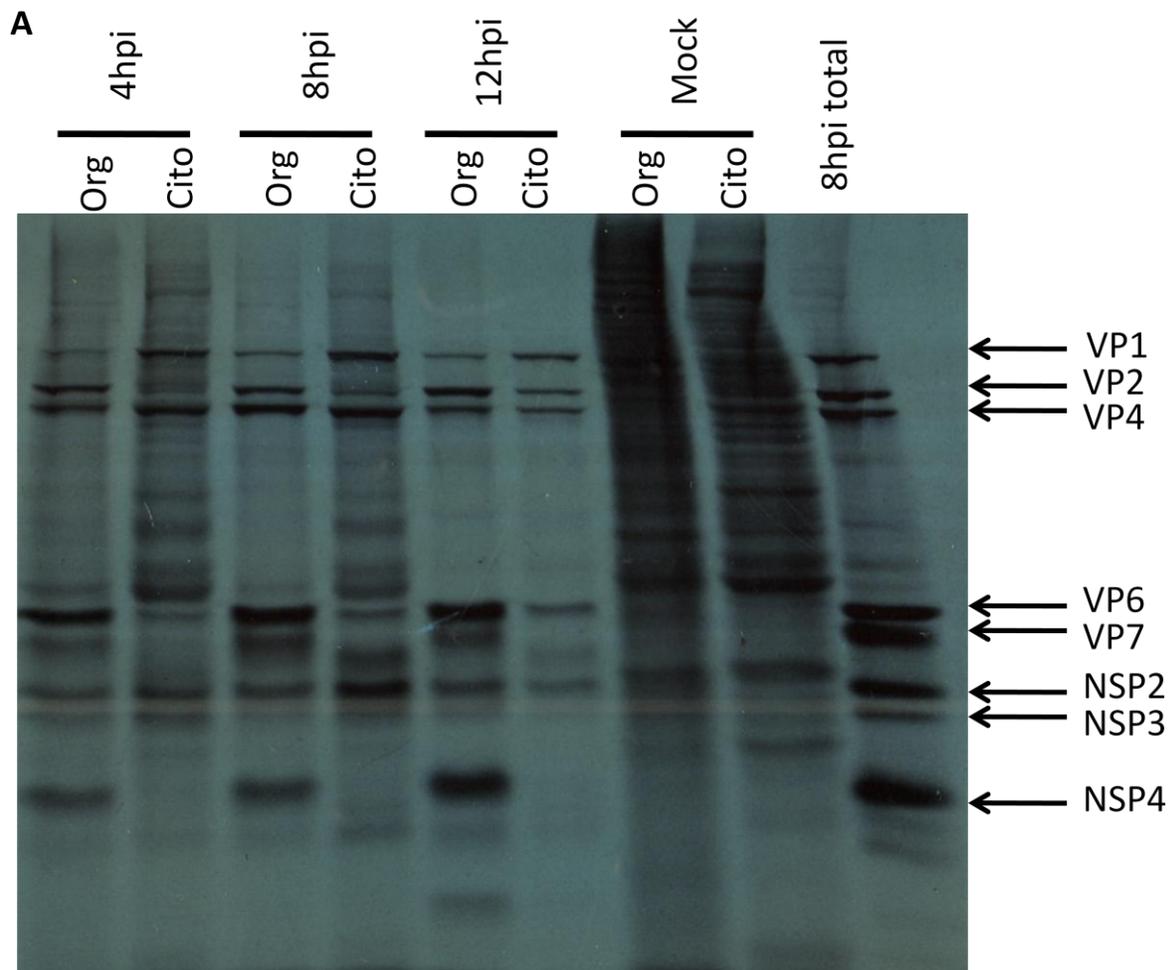
En el caso de NSP4, de manera esperada sólo aparece en la fase organelar del fraccionamiento, lo que correlaciona con los datos reportados hasta ahora para esta proteína (Fig. 13 panel B).

Como sabemos NSP2 y NSP5 son proteínas marcadoras de viroplasma, en los experimentos anteriores encontramos que la mayoría de NSP5, se encuentra en la rica en organelos y membrana del fraccionamiento (Fig. 13 panel B) sin embargo, podemos observar que conforme avanza la infección hay un aumento en la concentración de NSP2 no soluble y soluble hasta que a las 12 horas observamos que la relación de la

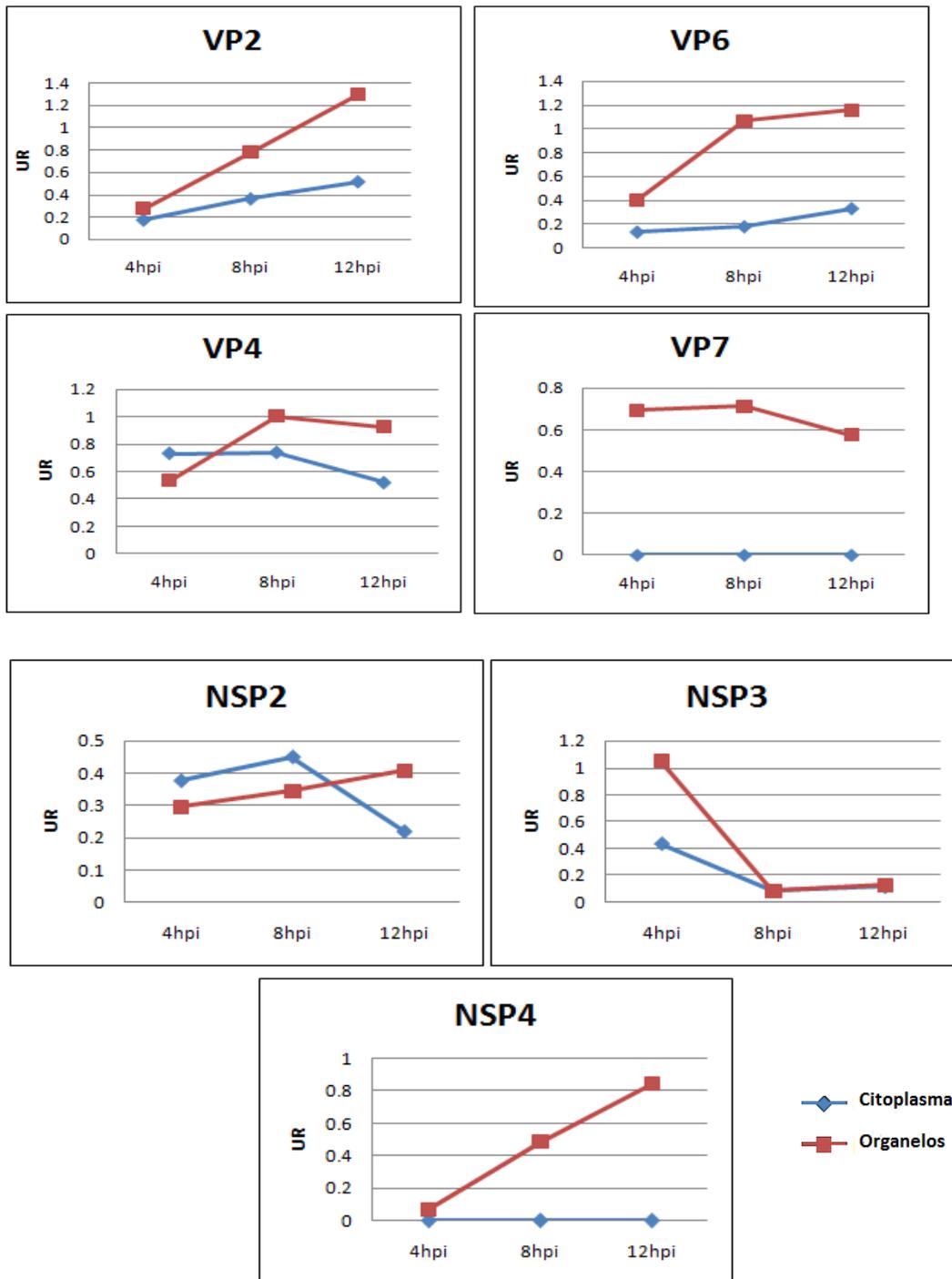
concentración organelo-citoplasma de esta proteína se invierte a expensas de una reducción marcada en la concentración de NSP2 en la fracción citoplasmica.

Finalmente como se ha mencionado anteriormente NSP3 es una proteína importante en la regulación de la traducción de proteínas virales, a las 4hpi se observa que esta proteína se encuentra en mayor concentración en la fase no soluble, sin embargo a las 8 hpi su concentración es la misma en las dos fases y esto se mantiene hasta las 12hpi.

Estos datos en conjunto nos muestran la distribución de proteínas virales sintetizadas *de novo*, por un lado las proteínas de cápside viral se encuentran enriquecidas en la fracción no soluble, mientras que en la fracción soluble logramos observar todas las proteínas virales con excepción de las sintetizadas en el RE, y esta distribución se mantiene a lo largo del ciclo de infección.



**B**



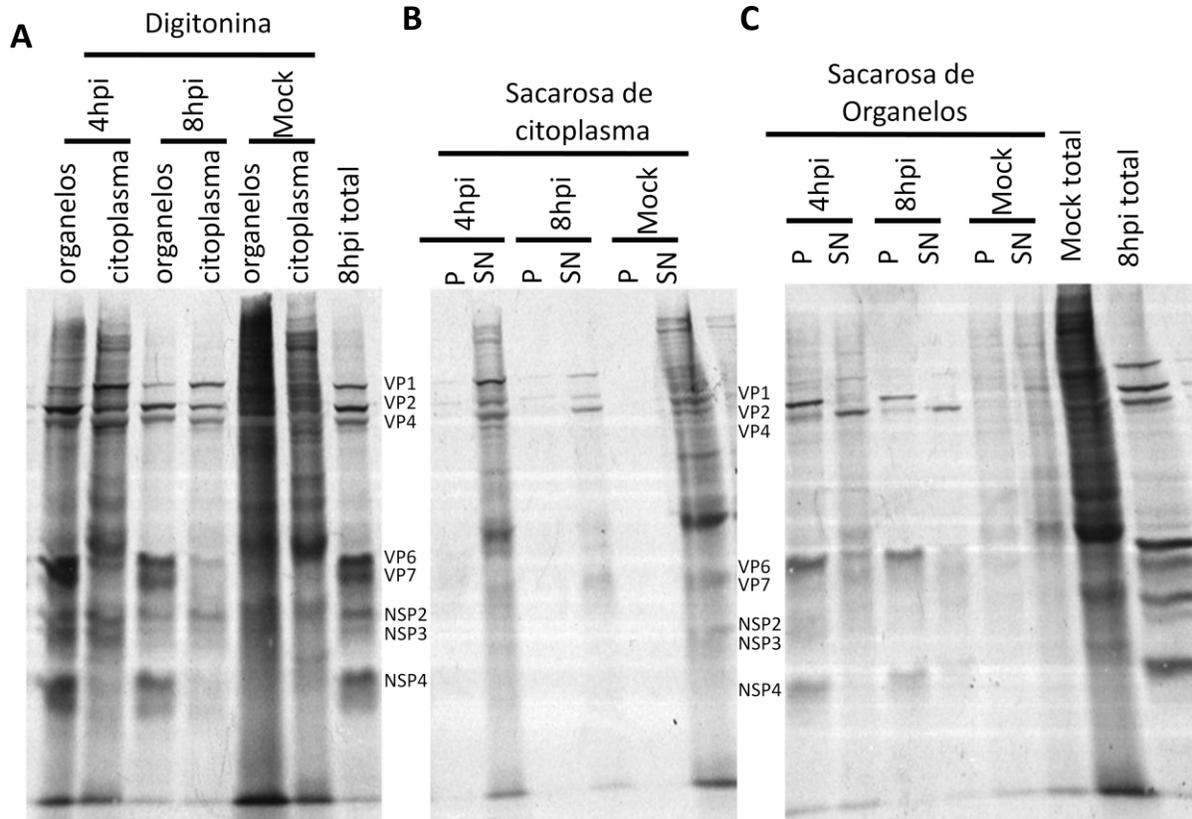
**Figura 13. Comparación organelo-citoplasma de síntesis de *novo* de proteínas virales**

**A)** Autorradiografía de lisados virales marcados por 1hr con metionina  $S^{35}$  durante los tiempos indicados y posteriormente fraccionadas con digitonina, utilizando como controles células no infectadas y un lisado total a 8hpi. **B)** Densitometría de las autorradiografías realizadas mediante el programa imageJ, en todos los casos la cuantificación se hizo normalizando los datos con respecto a la concentración de la proteína respectiva en el lisado total de 8hpi. Las concentraciones se encuentran representadas en Unidades Relativas.

## **Detección organelo-citoplasma de partículas virales**

Se sabe que la mayor parte de la infección de RV tiene lugar en el citosol, es en este sitio en donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral, la transcripción, la traducción de proteínas virales, así como las primeras fases de la morfogénesis del virus (formación de DLP y la encapsidación del genoma viral). Por otra parte, el RE también juega un papel importante durante la infección, ya que en este organelo se realiza la traducción de glicoproteínas virales (VP7) así como la síntesis de la enterotoxina viral NSP4, por otro lado, las DLPs recién sintetizadas requieren entrar al lumen del RE en donde se termina la maduración de la partícula viral adquiriendo la última capa de la cápside. Sin embargo, aún se desconoce el momento en que comienza la morfogénesis viral así como la distribución de partículas virales entre organelos y el citoplasma. Por lo que nos preguntamos qué tanto de la proteína viral detectada en los ensayos anteriores se encuentra ensamblada formando partículas o intermediarios de morfogénesis viral (DLP, SLP). Para contestar esta pregunta realizamos un ensayo en el que marcamos proteínas radioactivamente tal y como se ha descrito anteriormente a las 4hpi y 8hpi, y posteriormente realizamos un fraccionamiento con digitonina (como control negativo utilizamos células sin infectar y como control positivo un lisado total a 8hpi). Para separar las partículas virales de proteínas no ensambladas las fracciones obtenidas se ultracentrifugaron sobre un colchón de sacarosa al 40%, de tal manera que en el pellet obtenido se encontrarán partículas ensambladas, agregados y complejos proteicos mientras que en el sobrenadante del colchón encontraremos todas las proteínas solubles. Para mostrar que las muestras obtenidas con el primer fraccionamiento son iguales a las mostradas anteriormente, primero realizamos una autoradiografía con las fracciones antes de pasarlas por el colchón de sacarosa, en el cual observamos que se reproduce exactamente el mismo resultado del experimento anterior (Fig. 13 panel A y Fig. 14 panel A izquierda). Al pasar la fracción citoplásmica del fraccionamiento con digitonina por el colchón de sacarosa observamos que prácticamente no hay proteínas en el pellet lo que indica que no hay partículas o subpartículas virales en el citoplasma. Aunque de manera interesante, al sobre-exponer los films logramos observar 3 proteínas que por su peso podrían ser VP1, VP2 y VP3, las cuales son las proteínas que forman la capa más interna de

la cápside de RV (SLP), lo que nos hace pensar que podríamos estar observando un intermediario de replicación y morfogénesis rotaviral (Fig. 14 panel B). Por otro lado, fue sorprendente no encontrar DLPs en el citoplasma, ya que la formación de estas partículas se lleva a cabo en inclusiones citoplásmicas denominadas viroplasma. Este dato se podría explicar si pensamos que la exportación de DLPs hacia el RE es inmediata después de su formación, de esta manera la concentración de las DLPs citoplásmicas “libres” se mantiene lo suficientemente baja para ser indetectable por este método. Es de resaltar también que al menos hasta las 8hpi no observamos TLPs libres en citoplasma, estos resultados pueden explicarse por: 1) El RE funciona como un almacén de virus armados; 2) Una vez que el virus se ha ensamblado completamente requiere de alguna interacción con membranas celulares, 3) Puede ser que simplemente se requiere que la infección prosiga hasta proporcionar un medio citoplásmico en el que las TLPs puedan liberarse. Por otra parte, al centrifugar la fracción enriquecida de organelos y membranas obtenida a partir del fraccionamiento con digitonina sobre el colchón de sacarosa logramos detectar a las proteínas de la cápside en el pellet, lo que indica que las TLPs y las DLPs se encuentran en la fracción en organelos o ancladas a membranas. Encontrar dichas partículas virales en esta fracción no fue sorprendente debido a que los pasos finales de la morfogénesis viral son llevados a cabo dentro del RE. Además, cabe destacar que en esta fracción también logramos observar a NSP4, aunque se sabe que esta proteína no forma parte de ningún complejo podemos explicar su presencia en esta fase debido a que es una proteína membranal y por lo tanto tenderá a ser arrastrada hacia el pellet por las membranas a las que se encuentra asociada. Finalmente podemos observar como proteínas libres en la fracción organelar a VP4 y posiblemente a VP7. Este resultado era de esperarse ya que estas proteínas se sintetizan en el RE (Fig. 14, panel A derecha y panel C).

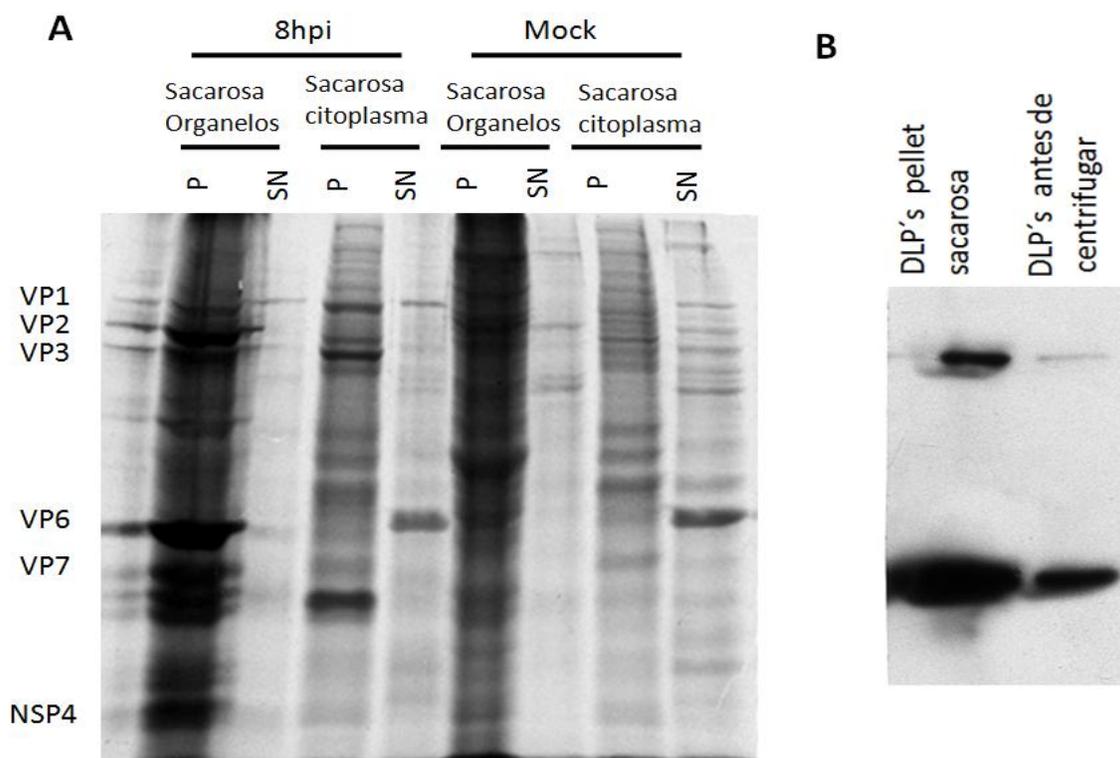


**Figura 14. Distribución organelo-citoplasma de partículas virales**

Células MA104 infectadas fueron marcadas con metionina radioactiva por una hora antes de cosecharse, se lisaron y fueron fraccionadas con digitonina, posteriormente las fracciones citoplásmicas y de organelos obtenidas de este primer fraccionamiento se centrifugaron por un colchón de sacarosa para separar virus particulado y proteínas agregadas (Pellet) de proteínas no agregadas (SN). Autoradiografías de fraccionamiento con digitonina (izquierda) **A**) de las muestras obtenidas de los colchones de sacarosa del citoplasma **B**) y los organelos (derecha) a 4hpi y 8hpi **C**).

Los procesos de replicación, empaquetamiento del genoma viral así como los primeros pasos de la morfogénesis son al parecer procesos interdependientes; existen reportes en los que aíslan sub-partículas virales formadas por VP1, VP2 y VP3, las cuales han mostrado actividad de replicasa en experimentos *in-vitro* (Helmberger-Jones and Patton 1986; Gallegos and Patton 1989). Estos datos sugieren que las 3 proteínas virales encontradas en el pellet de la fracción citoplásmica podrían estar formando un intermediario de replicación. Para comprobar la presencia de VP1, VP2 y VP3 como complejo en la fracción citoplásmica, decidimos realizar un fraccionamiento de un lisado de una infección de 8hr

en el que marcamos radioactivamente a las proteínas por 2hr. Por otro lado, para comprobar que la centrifugación a través del colchón de sacarosa permite separar una fracción particulada de una fracción soluble, centrifugamos DLPs purificadas por el colchón de sacarosa (Fig. 15, panel B). Mediante este método logramos observar claramente la presencia de lo que por peso molecular aparentemente son las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 de RV, las cuales no se encuentran en las células no infectadas (Fig. 15, panel A). De manera interesante, además de estas 3 proteínas observamos otra proteína que también se encuentra formando parte de un complejo proteico, por su peso molecular esta proteína podría ser la proteína marcadora de viroplasmos NSP2 o la proteína NSP3.

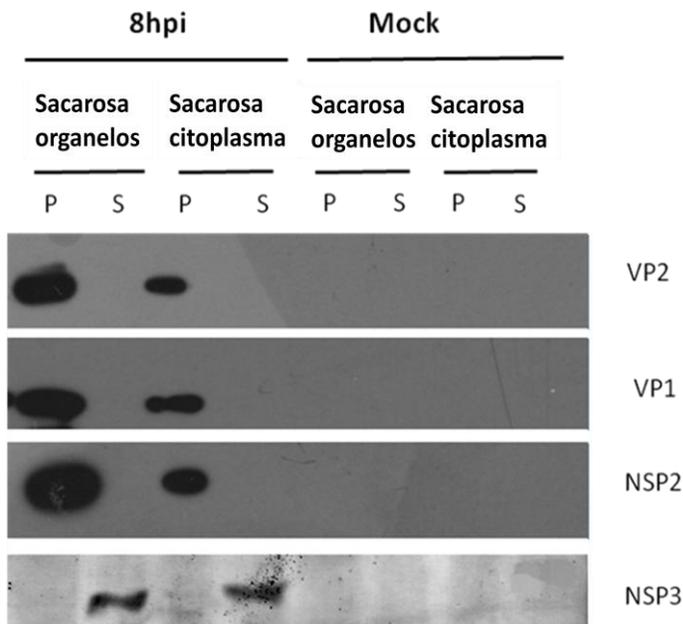


**Figura 15. Detección de proteínas agregadas citosolicas.**

**A)** Autoradiografía hecha a partir de lisados de células infectadas o no infectadas (MOCK) a 8hpi marcadas durante 2hr con  $S^{35}$ , las células fueron fraccionadas con digitonina y las fracciones del pellet y el sobrenadante se centrifugaron sobre un colchón de sacarosa para separar las proteínas particuladas de las libres. En este paso los pellets se concentraron resuspendiendo en un volumen muy pequeño por lo que la concentración de proteínas que se muestra en los pellets y los sobrenadantes es distinta. Por este método logramos observar 4 proteínas asociadas en la fracción citoplásmica, mientras en la fracción no soluble se

observan todas las proteínas que forman las TLPs. No observamos ninguna proteína viral en células no infectadas. **B)** WB utilizando el anticuerpo contra TLPs, a muestras de DLPs purificadas (derecha) que fueron centrifugadas por un colchón de sacarosa y concentrados en un menor volumen (banda izquierda).

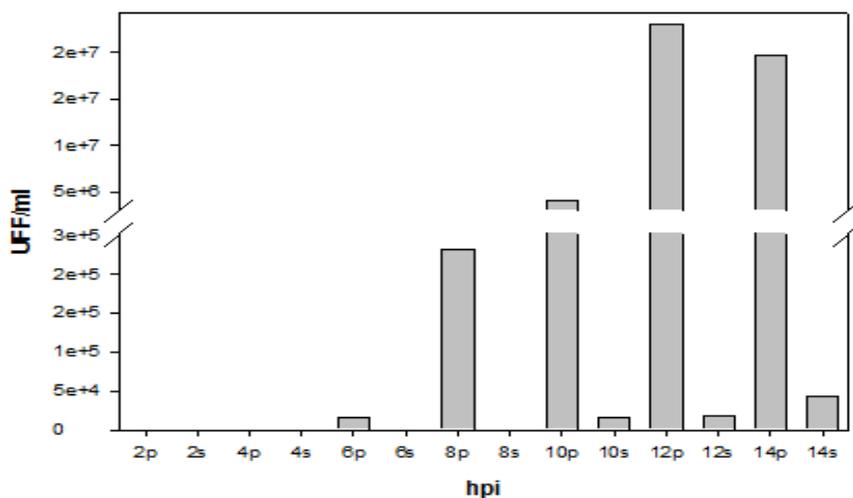
Las proteínas que se encontraron asociadas en la fracción citoplásmica fueron identificadas mediante WB utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas (VP1 y VP2). En la figura 16 se muestra que efectivamente las proteínas observadas en la autoradiografía son VP1 y VP2. No fue posible realizar un WB para VP3 ya que no contamos con un anticuerpo específico para esta proteína. Por otra parte, para determinar que otras proteínas virales co-migran con VP1, VP2 y VP3 también realizamos un WB contra las proteínas NSP2 y NSP3. El resultado muestra que la cuarta proteína observada en la autoradiografía es NSP2 mientras que NSP3 no se encuentra asociada a ninguna partícula ni en la fracción citoplásmica, ni en la no soluble (Fig. 16). En resumen, estos datos muestran que las proteínas VP1 y VP2 (y probablemente VP3) se encuentran asociadas entre sí formando un complejo posiblemente encargado de la replicación del genoma viral. De la misma manera el encontrar a NSP2 en esta fracción nos indica que este complejo de replicación posiblemente se encuentra asociado a viroplasmos.



**Figura 16. Proteínas formadoras de complejo en la fracción citoplásmica**

WB contra VP1, VP2, NSP2 y NSP3 de células MA104 infectadas por 8hpi y no infectadas fraccionadas a mediante digitonina y posteriormente pasadas por un colchón de sacarosa, en este experimento logramos determinar que las proteínas detectadas en el pellet de las fracciones citoplásmicas son VP1 VP2 y NSP2 mientras que NSP3 no se encuentra formando complejos en ninguna de las fracciones.

En los experimentos anteriores sólo logramos observar a las TLPs en la fracción no soluble durante las primeras 8hpi, estos resultados indican que hasta este tiempo las partículas virales se encuentran dentro de algún organelo o asociadas a algún tipo membrana. Para explorar si en algún momento de la infección las TLPs se encuentran libres en el citoplasma, infectamos células durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 hpi, y posteriormente realizamos un fraccionamiento con digitonina de cada una de las muestras y finalmente se tituló la infectividad de los virus presentes en las fracciones obtenidas. Los resultados de este ensayo muestran que aunque desde las 10hpi logramos observar una pequeña cantidad de virus libres en el citoplasma, durante todo el ciclo de infección la mayor cantidad de TLPs se encuentra en la fracción no soluble (Fig. 17), lo que sugiere que el virus infeccioso siempre se mantiene ya sea en el interior de algún compartimiento de la célula o interactuando con alguna estructura celular.



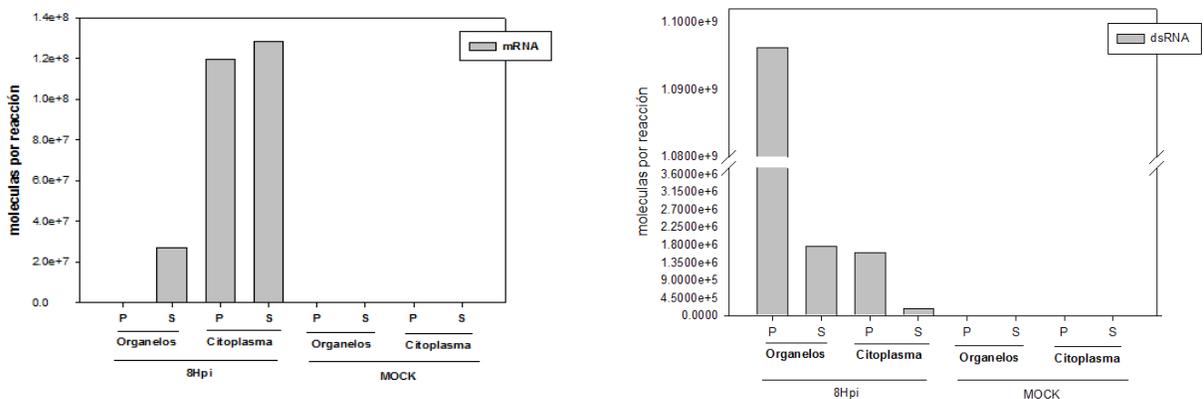
**Figura 17. Detección de progenie viral organelo-citoplasmica**

Gráfica en la que se muestra la infectividad de progenie viral obtenida en unidades formadoras de focos por ml (UFF/ml) de una cinética de 2 a 14hpi fraccionada con digitonina,.

## DetECCIÓN DE RNA VIRAL

Una vez que determinamos la distribución organelo-citoplásmica de las partículas y subpartículas virales determinamos la distribución de los mRNAs y el dsRNA en las fracciones y determinar si esta correlaciona con la distribución de las partículas virales anteriormente descritas. Para lo anterior realizamos qPCR's de las fracciones citoplásmicas y no solubles después de centrifugarlas a través de sacarosa.

Los resultados muestran que la mayor concentración de dsRNA se encuentra en el pellet de la fracción organelar, en donde se encuentran todas las TLPs y DLPs (Fig. 18), por lo que podemos suponer que este es dsRNA genómico encapsinado. Por otra parte también encontramos dsRNA en el sobrenadante de la fracción organelar. En el caso de la fracción citoplásmica encontramos la mayor concentración de dsRNA en el pellet (Fig. 18), probablemente interactuando con los posibles intermediarios de replicación viral. También encontramos una baja concentración de dsRNA libre en el citoplasma de la célula. Por otra parte en la fracción no soluble encontramos una baja concentración de mRNA (Fig. 18), mientras encontramos la mayor cantidad de mRNA viral en las fracciones citoplásmicas tanto en el pellet, probablemente asociado a ribosomas o a los intermediarios de replicación, como en el sobrenadante libre en el citoplasma celular.



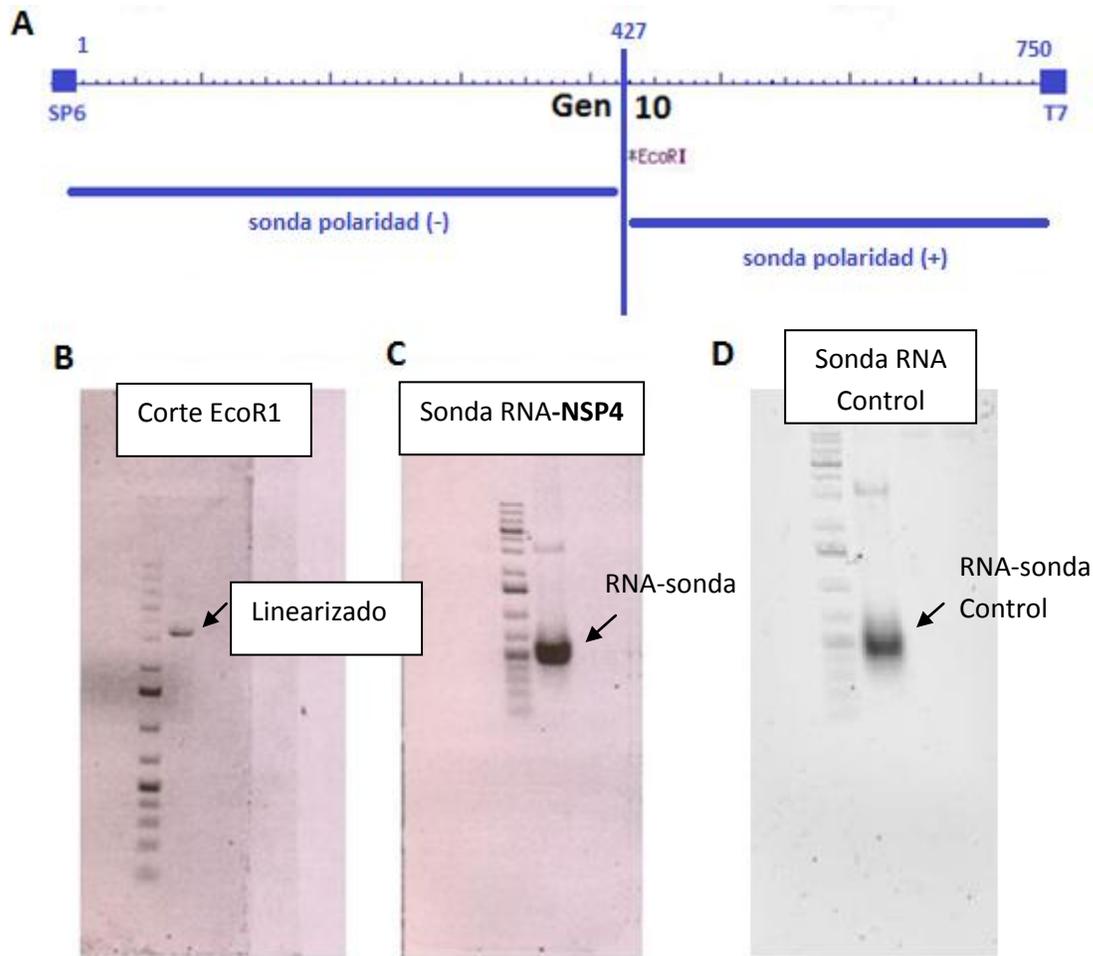
**Figura 18. Detección de RNA viral particulado y no particulado**

Muestras de células infectadas por 8hr y no infectadas fueron fraccionadas mediante digitonina y pasadas por sacarosa. Posteriormente se realizó un qPCR para determinar la concentración de RNA viral de cada una de las muestras obtenidas del colchón de sacarosa.

## **Inicio de la transcripción durante la infección**

Para determinar el momento y el lugar en la célula en que inicia la transcripción viral realizamos ensayos de hibridación fluorescente *in situ* (por sus siglas en inglés FISH). Para estos ensayos se utilizó una sonda de RNA que reconoce al mRNA del segmento 10 que codifica para NSP4 de la cepa RRV de RV. La secuencia utilizada en el diseño de la sonda está reportada en el banco de datos de NCBI bajo el GI: 186910047. A esta secuencia se le determinó el patrón de corte con varias enzimas de restricción mediante la utilización del programa NEBcutter disponible en línea. De esta manera se observó que el segmento 10 sólo tiene un sitio de restricción para la enzima Eco RI entre los nucleótidos 427 al 431 (Fig. 19, panel A).

Para la obtención de la sonda se utilizó el plásmido PGem3Z-NSP4; en este plásmido el gen de NSP4 se encuentra flanqueado por los promotores de las polimerasas T7 y SP6. Este vector se linearizó utilizando la enzima de restricción Eco RI (Fig. 19, Panel B en medio), y ya que el plásmido no tiene sitios de corte para esta enzima, el único sitio de restricción en esta construcción es el aportado por el segmento 10 del genoma rotaviral. Posteriormente, para la obtención de la sonda de RNA se realizó una reacción de transcripción *in vitro* utilizando un promotor SP6, en donde la sonda fue marcada utilizando UTP-Digoxigenina (Fig. 19, Panel B derecha); por otro lado, utilizando un promotor de T7 se obtuvo una sonda control la cual es complementaria al RNA de polaridad negativa.



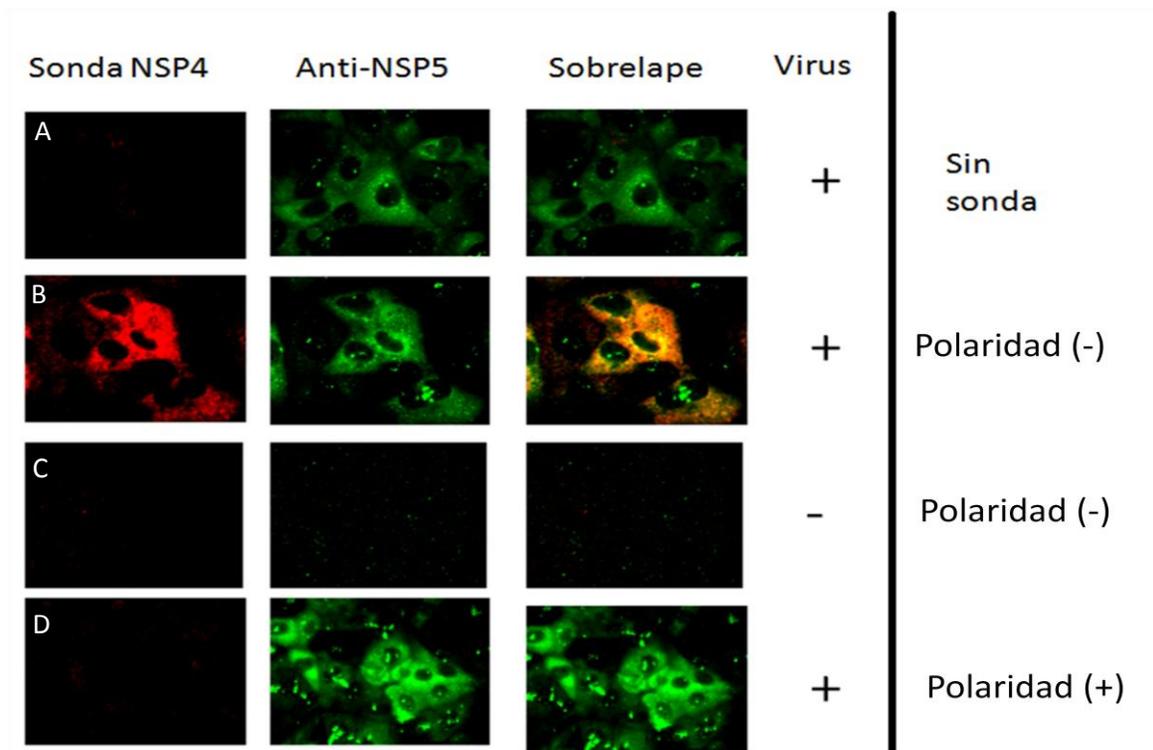
**Figura 19. Obtención de la sonda de RNA del segmento 10**

**A)** Diagrama del gen 10 de RV en donde se muestra el único sitio de restricción que tiene para la enzima EcoRI (arriba), así como una representación de las dos sondas obtenidas por transcripción *in vitro* utilizando cada uno de los promotores. **B)** gel de agarosa en el que se muestra el plásmido linearizado con EcoRI (que corta sólo en un sitio). **C)** gel de agarosa en el que se corrió 1ul del producto de la transcripción *in vitro* utilizando la polimerasa de SP6 y marcándolo con UTP-DIG. El producto es un fragmento de RNA complementario al mRNA del segmento 10 del genoma de RV, el cual se utilizó como sonda para hibridación *in situ*.

### **Hibridación *in situ***

Para demostrar que la sonda obtenida es funcional para determinar la localización del segmento 10 de RV realizamos un ensayo de FISH a las 6 horas post infección ya que a este tiempo la concentración de mRNA viral es muy grande, de manera tal que si la sonda

es capaz de hibridar con los transcritos del segmento 10 de RV se observara una señal proveniente de la sonda en esta condición, además de que ya ha sido reportado que la localización del mRNA de este segmento a este tiempo es citoplásmica (Ayala-Breton, Arias et al. 2009), por lo que también se realizo una comparación de los resultados obtenidos de este ensayo con los reportados en la literatura. Para comprobar la especificidad del ensayo se realizó una inmunolocalización utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -NSP5, lo cual nos permite localizar viroplasmias (utilizada aquí como marcadores de células infectadas), así como una condición control de células sin infectar (Fig. 20 panel C). De la misma forma, para demostrar que la señal fluorescente es producto de la hibridación de la sonda, se realizó un control de células infectadas, las cuales no fueron tratadas con la sonda (Fig. 20 panel A). Para comprobar la especificidad del anticuerpo contra NSP5 se realizó un control con células no infectadas tratadas con  $\alpha$ -NSP5 (Fig. 20 panel C), y finalmente, para demostrar que la sonda sólo tiene acceso a mRNA viral y no al genoma viral (dsRNA) se utilizó un control con células infectadas que fueron tratadas con una sonda complementaria al RNA de polaridad negativa (RNA (-)) (Fig. 20 panel D). Como se esperaba, sólo se obtuvo señal proveniente de la sonda en la condición experimental, de la misma manera también se observó que la señal de la sonda sólo se encuentra en las células NSP5 positivas (Fig. 20 panel B). Finalmente se observó que la localización del mensajero del segmento 10 es citoplasmática, lo cual es consistente con el patrón reportado previamente. Estos datos muestran que la sonda complementaria al mRNAs de NSP4 funciona de manera específica para marcar a los transcritos del segmento 10 de RV.



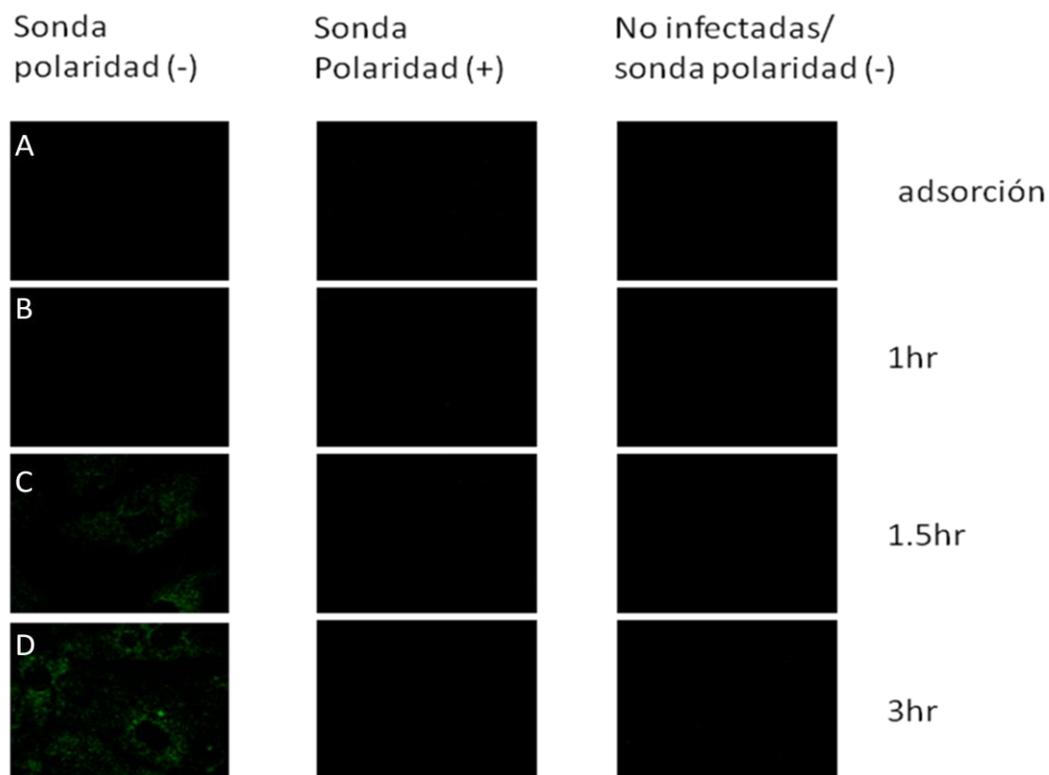
**Figura 20. Hibridación in situ**

Imágenes de FISH obtenidas utilizando una sonda de RNA complementario al mRNA de NSP4 (rojo) e inmunofluorescencia de viroplasmos utilizando  $\alpha$ -NSP5 (verde), la condición experimental fueron células infectadas tratadas con la sonda **(B)** y como control se utilizaron las siguientes condiciones; células infectadas sin tratamiento con la sonda **(A)**, células no infectadas con sonda **(C)** y células infectadas tratadas con una sonda complementaria al RNA (-) **(D)**. Se observa una señal específica proveniente de la hibridación de la sonda con el mRNA del segmento 10 de RV (comparar B con A, C y D paneles de izquierda).

### Caracterización del inicio de la transcripción

Una vez que comprobamos la especificidad de la hibridación de la sonda de NSP4 con los transcritos del segmento 10, tratamos de determinar en qué momento de la infección se puede detectar a los mRNAs de NSP4 por medio de hibridación *in situ*, de esta manera correlacionaremos el momento en el que comencemos a ver señal proveniente de la sonda con el inicio de la transcripción. Para esto realizamos un ensayo de FISH a distintos tiempos de la infección de RV (0, 1, 1.5, 2 y 3hpi). Las condiciones utilizadas en este experimento fueron células infectadas tratadas con la sonda  $\alpha$ -NSP4; como control para probar que la señal obtenida es específica se utilizaron células tratadas con la sonda

contra la cadena de polaridad negativa, así como células sin infectar (Fig. 21). Mediante esta técnica logramos detectar mRNA del gen 10 de RV a partir de las 1.5hpi (Fig. 21 panel C), se observa que la cantidad de mensajeros marcados aumenta conforme avanza el ciclo de infección (Fig. 21 panel D), mientras que en horas más tempranas no logramos ver ninguna señal proveniente de sonda (Fig. 21 paneles A y B). Estos resultados nos dan una idea de que el inicio de la transcripción se da aproximadamente a 1.5hpi, aunque debido a la resolución de esta técnica no podemos descartar que la transcripción comience antes de este tiempo. (Fig. 21 panel C).

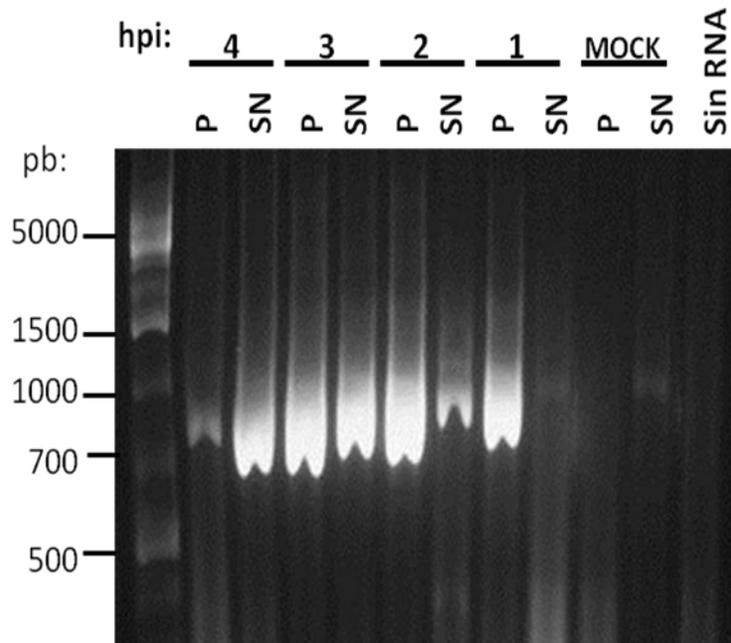


**Figura 21. Inicio de la transcripción**

Marcaje del mRNA del gen 10 de RRV (verde), mediante hibridación *in situ* a distintos tiempos de la infección para determinar el momento en el que se da el inicio de la transcripción de los genes virales, los controles utilizados son células no infectadas tratadas con la sonda en la que no se observa ninguna señal, así como células infectadas tratadas con la sonda de polaridad negativa en la que tampoco observamos señal.

## **Identificación de compartimiento celular donde inicia la transcripción**

Como se ha mencionado anteriormente, datos en la literatura apuntan a que RV entra mediante un proceso de endocitosis, y se piensa que el desnudamiento de la partícula viral se da dentro de una vesícula de procedencia endocítica y este proceso es necesario para su escape hacia el citoplasma (Ruiz, Cohen et al. 2000). Por otro lado, se sabe que la partícula resultante del desnudamiento de RV (DLP) es transcripcionalmente activa, sin embargo no se ha podido determinar si las DLPs requieren llegar al citoplasma para iniciar la transcripción del genoma viral o si son capaces de comenzar este proceso dentro de las vesículas en las que se encuentran. Por lo que, una vez que comprobamos que mediante el fraccionamiento con digitonina podemos separar fracciones enriquecidas con proteínas citoplásmicas por una parte y de procedencia membranal y de organelos por otra, nos preguntamos en cuál fracción se encuentra el RNA viral durante las primeras 4 horas de infección. Para esto realizamos un ensayo de RT-PCR con las fracciones de sobrenadante y pellet de células infectadas y cosechadas a las 1, 2, 3, y 4hpi. En la Figura 22 se muestra un gel de agarosa en el que se corrió el producto de RT-PCR de cada condición; en este caso los controles negativos utilizados fueron el RNA aislado de células no infectadas y una reacción RT-PCR sin RNA, los cuales no presentaron ninguna señal. Con esta técnica se logró detectar el RNA viral desde la primera hora de infección en la fracción no soluble en donde se encuentran los organelos y membranas, mientras que sólo logramos ver RNA en la fracción citoplásmica a partir de la 2hpi (Fig. 22). Aunque debido a que observamos el RNA total del virus no podemos discernir entre mRNA y RNA genómico viral, estos datos sugieren que durante la primera hora el virus entrante se encuentra en su mayoría dentro de algún compartimento celular, probablemente el endosoma. Otra observación importante es el aumento gradual en la concentración de RNA citoplásmico mientras que el RNA presente en la fracción insoluble disminuye para las 4hpi (Fig. 22). De manera esperada en los controles de células no infectadas y en el carril en el que se corrió el producto de una amplificación sin RNA no se observó ninguna banda.

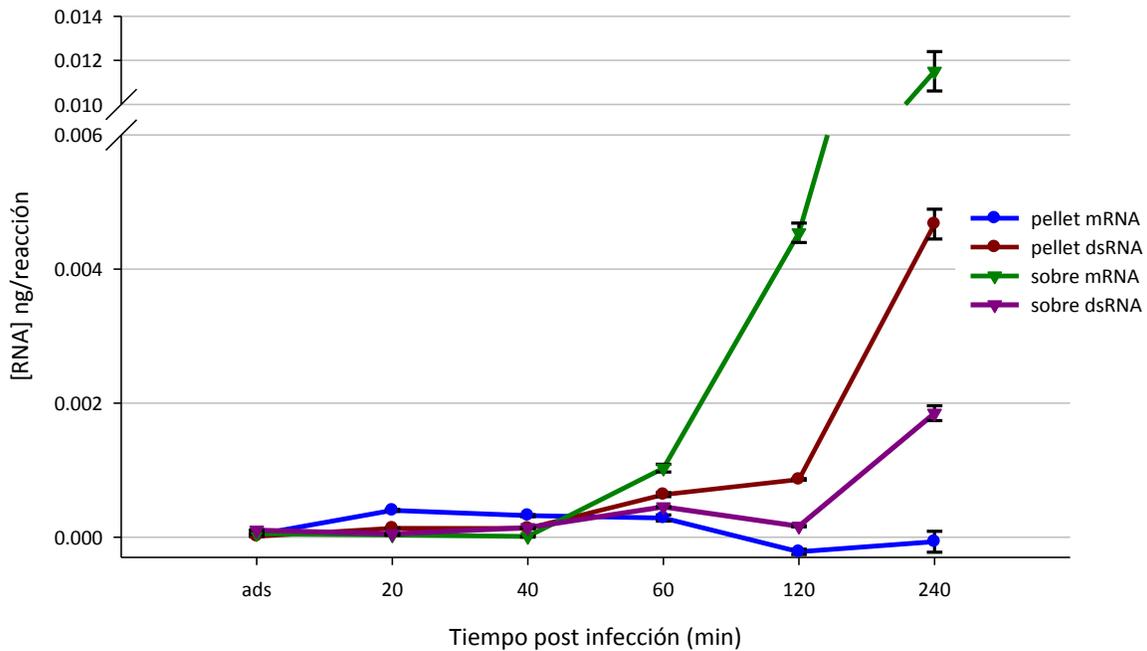


**Figura 22. PCR de RNA total viral de las muestras del fraccionamiento**

Gel de agarosa en el que se muestran los productos de RT-PCR del gen 10 obtenidas a distintos tiempos post infección. Sobrenadante (SN), pellet (P)

Para determinar de una manera más fina el sitio celular en el que se encuentra el RNA viral durante las primeras horas de infección realizamos un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) de las fracciones obtenidas con digitonina, utilizando primers específicos para detectar las cadenas de RNA de polaridad positiva (como marcador de mRNA y dsRNA) y de RNA de polaridad negativa (como marcador de dsRNA genómico), con la finalidad de determinar con mayor precisión el momento en el que inicia la transcripción, así como el compartimiento celular en el que inicia la transcripción de RV. Los tiempos de infección utilizados para este experimento fueron: inmediatamente después del periodo de la adsorción, 20min, 40min, 1, 2 y 4hpi, utilizando al gen de VP6 como reportero. Los resultados de este experimento muestran un pequeño aumento en la concentración de mRNA de VP6 en el pellet, llegando al máximo de concentración a los 20 minutos de infección y posteriormente se observó una disminución gradual del mRNA en esta fracción hasta llegar a 0 y que se mantiene así hasta las 4hpi (Fig. 23, línea azul). Estos resultados sugieren que RV inicia la transcripción antes de la primera hora de infección y que posiblemente no necesita llegar al citoplasma para iniciar este proceso. En contraste, durante los primeros 40 minutos de infección no se observó mRNA en la fracción

citoplásmica, sin embargo comenzamos a detectarlo a los 40min y se observó que la transcripción de VP6 aumentó a los 60min manteniéndose esta forma de incremento hasta las 4hpi (Figura 23, línea verde). Detectar mRNA viral entre los 40 y los 60min post infección sugiere que el escape de RV de la vía endocítica hacia el citoplasma tiene lugar en estos tiempos de la infección. Por otro lado observamos que la concentración de dsRNA se incrementa de manera lineal en la fracción membranal desde los primeros 40min de la infección hasta las 2hpi, sin embargo se observó que la tasa de incremento en la concentración de dsRNA del pellet entre las 2 y las 4 hpi aumenta (Fig. 23, línea roja), probablemente debido al aumento de DLPs en citoplasma, los cuales son responsables de la transcripción secundaria. El dsRNA que observamos en la fracción membranal, posiblemente corresponde al RNA genómico de partículas virales recientemente formadas, las cuales se encuentran en el proceso de morfogénesis en el RE para la obtención de la última capa de la cápside. Finalmente, también se puede detectar dsRNA en el sobrenadante desde la primera hora de infección y dicha concentración aumenta con el progreso de la infección (Fig. 23, línea morada). Hasta hace poco tiempo se creía que el dsRNA sólo se encontraba en viroplasma y nunca de manera citoplásmica. Recientemente en nuestro laboratorio se mostró la presencia de dsRNA en citoplasma a través de inmunofluorescencias con anticuerpos  $\alpha$ -dsRNA (Rojas, Arias et al. 2010), de tal manera que encontrar dsRNA citoplásmico en este ensayo no es sorprendente; aunque por otro lado, la observación de dsRNA en ambas fracciones durante las primeras 4h de infección nos hace pensar que la replicación del genoma de RV comienza desde tiempos de infección muy tempranos aún anteriores a la formación de viroplasma, lo que indica que este proceso no depende de la formación de viroplasma por lo menos al inicio de la infección.



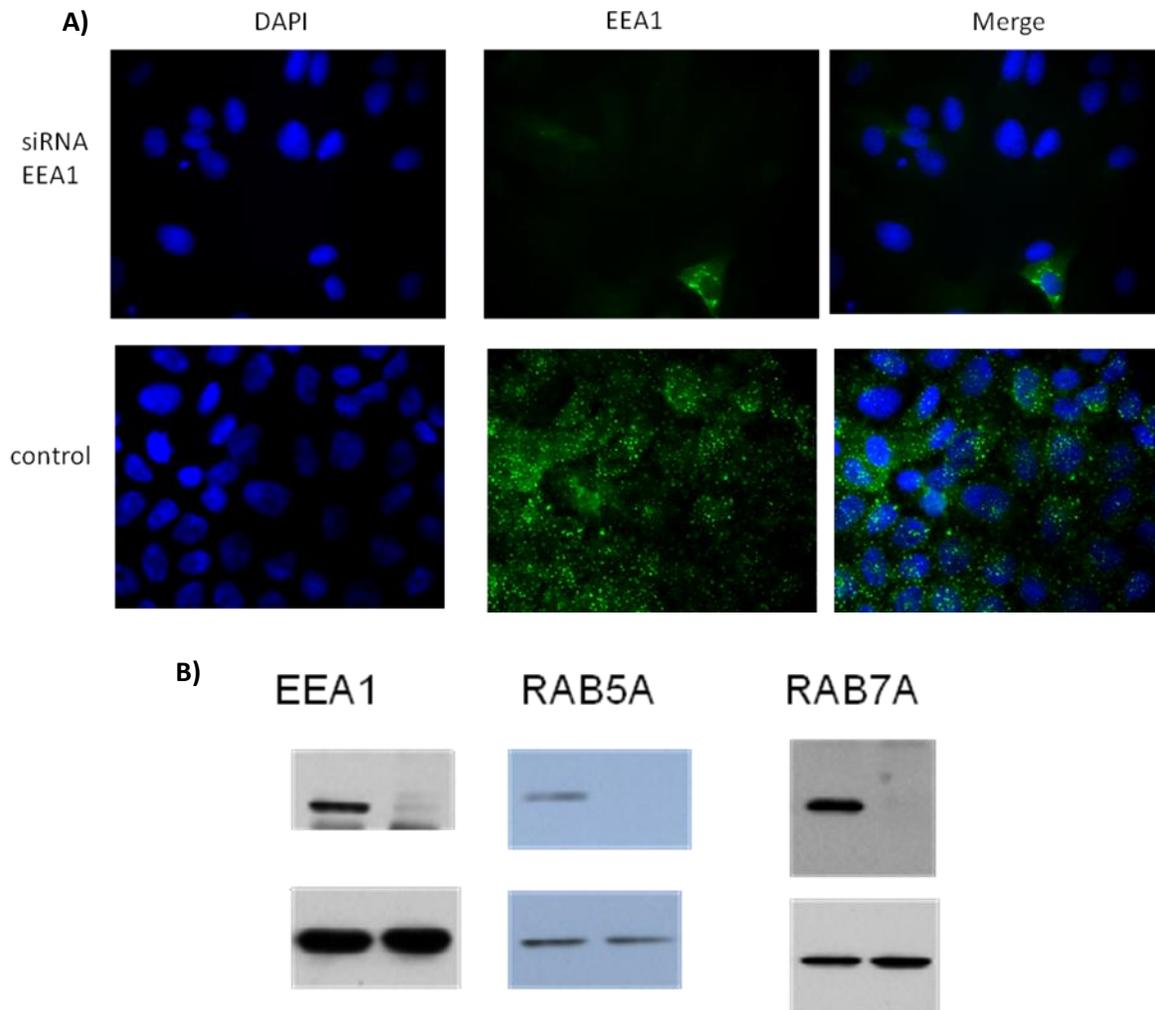
**Figura 23. Cuantificación de mRNA y dsRNA en fracciones organelo-citoplasma por medio de RT-PCR**

Gráfica en la que se muestra la concentración calculada por RT-PCR de mRNA y dsRNA del gen 6 (VP6) en las fracciones citoplásmicas (verde y morado respectivamente) y no solubles (azul y roja respectivamente) obtenidas a partir de muestras de lisados virales a los tiempos indicados.

## Escape de RV

Como se ha mencionado anteriormente, aunque existe una descripción detallada acerca de las primeras interacciones de la partícula viral con la célula huésped, aún no se ha caracterizado completamente la vía de entrada que siguen los RV para llegar al citoplasma de la célula y en qué punto de esta vía el virus atraviesa la membrana de la vesícula y llega a citoplasma. Como mencionamos en la introducción, se ha observado que después de la entrada, la cepa de RV RRV llega al endosoma temprano, posiblemente con la ayuda de la GTPasa Rab5 y posteriormente pasa a endosomas tardíos. Para establecer el punto en que el virus sale de este sistema de vesículas hacia el citosol celular decidimos silenciar la expresión de las GTPasas Rab5 y Rab7 y de la proteína EEA1 mediante siRNAs. Rab5 y EEA1 se silenciaron para inhibir la maduración hacia los endosomas tempranos y Rab7

para inhibir el paso de endosomas tempranos a endosomas tardíos. En la figura 24 se muestra la inhibición de cada una de las proteínas interferidas.

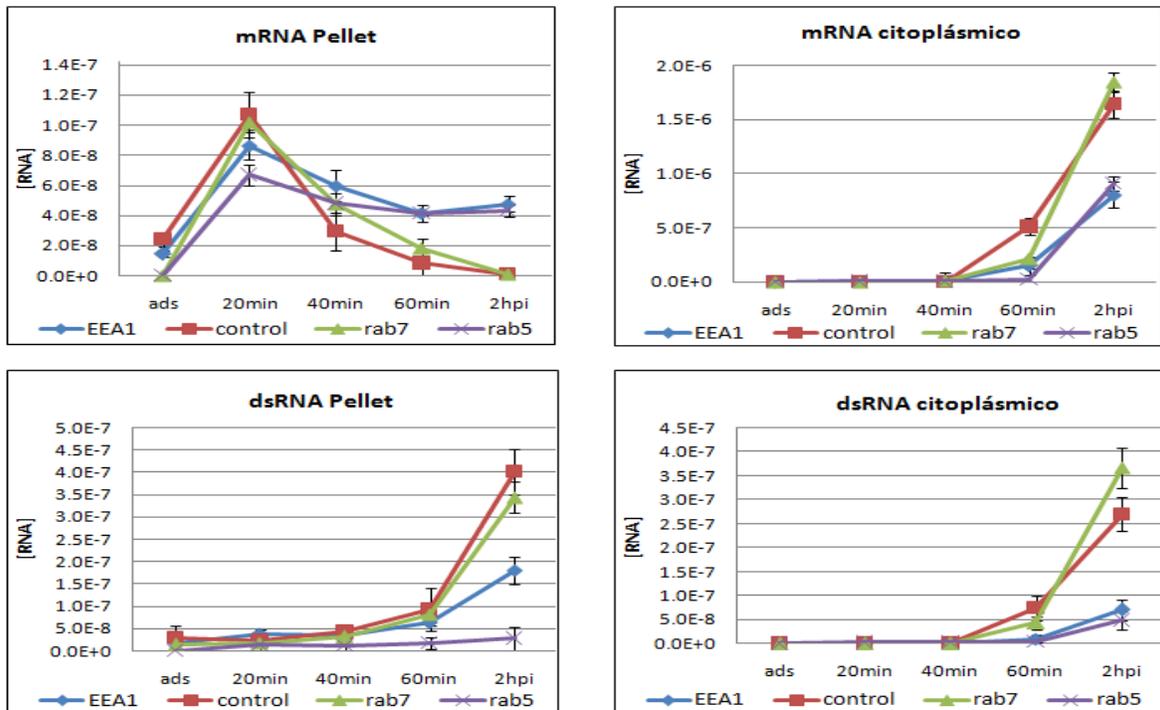


**Figura 24. Inhibición de EEA1, Rab5 y Rab7 mediante siRNAs**

(a) Inmunofluorescencia de células infectadas tratadas y no tratadas con un siRNA contra EEA1. En las células control se observa el patrón normal de distribución de la proteína EEA1, mientras observamos una disminución en la concentración de dicha proteína en las células tratadas con el interferente de EEA1. (b) detección de EEA1 y las GTPasas Rab5 y Rab7 mediante WB, en donde se puede observar claramente el silenciamiento de estas proteínas, como control de carga se utilizó vimentina para cada caso.

Una vez que comprobamos la disminución de las proteínas EEA1, Rab5 y Rab7, realizamos una cinética de infección de 0 a 2hpi y medimos la concentración de mRNA y del dsRNA

genómico mediante RT-PCR para cada fracción obtenida mediante el fraccionamiento con digitonina de células tratadas con los interferentes y utilizando como control células infectadas sin interferente. Los tiempos utilizados en cada caso fueron adsorción, 20, 40, 60, y 120min postinfección. Cuando las células son tratadas con los interferentes de EEA1 y Rab5 los resultados muestran una clara disminución en la concentración de mRNA citoplásmico así como una disminución de dsRNA en ambas fracciones con respecto de las muestras no tratadas (Fig. 25 comparar líneas morada y azul con línea roja), mientras que no se observa diferencias significativas en la concentración de mRNA y RNA genómico en ninguna de las fracciones de las células tratadas con Rab7 al compararlas con las células control. De manera interesante al medir la concentración de mRNA en la fracción no soluble de las células tratadas con los interferentes para Rab5 y EEA1 observamos el incremento de concentración previamente descrito a los 20min de infección; sin embargo la concentración del mRNA no disminuyó en esta fracción, mientras que en las células control y tratadas con el interferente de Rab7 observamos el decaimiento en la concentración del mRNA en el pellet prácticamente hasta llegar a 0 a las 2hpi. Estos datos sugieren que el virus se queda atrapado en vesículas procedentes de la etapa temprana de la vía endosomal.



**Figura 25. Concentración organelo-citoplásmica de RNA viral en células tratadas con siRNAs**

Gráficas de concentración de mRNA y dsRNA viral obtenidas a partir qPCR hecho de lisados fraccionados con digitonina, obtenidos de células tratadas con interferentes contra; EEA1 (azul), Rab5 (morado), Rab7 (verde) y células no tratadas (rojo).

## Discusión

### Inicio de la transcripción y distribución de RNA viral

Como sabemos durante la entrada de RV, la partícula viral pierde la capa más externa de la cápside en un proceso denominado desnudamiento; este proceso libera a las DLPs, las cuales son capaces de llevar a cabo la transcripción de los genes virales (revisado en (Baker and Prasad 2010)). Dado que el desnudamiento se lleva a cabo dentro de vesículas endocíticas, se desconoce si las DLPs necesitan llegar al citoplasma para comenzar la transcripción viral o si son capaces de iniciar este proceso dentro de las vesículas endocíticas. De manera sorprendente encontramos que hay un aumento en la concentración de mensajeros a los 20 minutos en la fracción no soluble lo que es una muestra de que los RV posiblemente puedan iniciar la transcripción dentro de las vesículas durante su entrada o asociadas a membrana. Otro dato que apoya la hipótesis de que la transcripción comienza desde las vesículas endocíticas, es la disminución en la concentración de mensajeros virales observada después de los 40min de infección en la fracción no soluble, mientras la concentración de mRNA en el citoplasma aumenta. Por otro lado al inhibir EEA1, o Rab5, proteínas que participan en la fusión de vesículas endocíticas entrantes con los endosomas tempranos no se observa dicha disminución de mensajeros en la fracción no soluble. Nuestros resultados también muestran que el virus comienza su transcripción de manera citoplásmica entre los 40 y 60min (Fig. 23). Ya que la partícula viral producto del desnudamiento de rotavirus es transcripcionalmente activa, de manera indirecta, el aumento de mRNA en la fracción no soluble sugiere que el desnudamiento de la partícula viral se puede dar desde los 20min post-infección.

Por otro lado no fuimos capaces de observar dsRNA durante los primeros 40 minutos de infección, lo que nos indica que no logramos observar a las partículas virales que están entrando a la célula. Sin embargo, observamos un incremento de dsRNA desde la 1<sup>a</sup>hpi, lo que nos da una idea de que la replicación del genoma viral se da desde el comienzo de la infección; además, también observamos que la tasa de replicación viral es prácticamente

lineal durante las primeras 2hpi. Cabe recalcar que no se pueden detectar viroplasmos durante la primera hora de infección y para las 2hpi la cantidad y el tamaño de los viroplasmos es baja (Carreno-Torres, Gutierrez et al. 2010), por lo que detectar replicación desde estos tiempos es sorprendente ya que se piensa que los viroplasmos son estructuras indispensables para la replicación del genoma. Por otro lado, hacia las 4hpi observamos que la tasa de replicación aumenta en gran medida. Este aumento en la tasa de replicación se puede deber a que para este tiempo la concentración de mRNA citoplásmico ya es muy grande y por otra parte al aumento de tamaño y número de viroplasmos por célula (Carreno-Torres, Gutierrez et al. 2010).

### **Endocitosis y entrada de RV**

Hasta el momento se tiene una caracterización precisa acerca de las primeras interacciones que llevan a cabo los RV con receptores y co-receptores en la célula huésped. Pero hasta ahora hay un pobre entendimiento de los pasos subsecuentes mediante los cuales los RV se internalizan. Por ahora es claro que estos virus necesitan de procesos activos para entrar al citoplasma celular (revisado en Baker and Prasad 2010). Resultados del laboratorio han mostrado que distintas cepas de RV pueden entrar mediante distintas vías endocíticas (Gutierrez, Isa et al. 2010). Por otro lado también sabemos que el desnudamiento de la partícula viral se lleva a cabo dentro de una vesícula de procedencia endocítica y este proceso es necesario para su escape hacia el citoplasma. Sin embargo, no se tiene un conocimiento detallado de a qué etapa del tráfico vesicular necesita llegar la partícula viral dentro de la vía endocítica para llevar a cabo su salida hacia el citoplasma celular. Nuestros resultados obtenidos por RT-PCR muestran que los RV se escapan de la vía endocítica entre los 40 y los 60min post-infección (Fig. 23). Por otro lado, también observamos que al inhibir EEA1 o Rab5 disminuye la concentración de mRNA y dsRNA en la célula, y ya que EEA1 y Rab5 son necesarias para la fusión de las vesículas entrantes con los endosomas tempranos (Seaman 2008), podemos sugerir que al menos se necesita de la maduración de la vesícula endocítica hasta el endosoma

temprano para que se dé el escape de RV hacia el citoplasma (Fig. 25). Estos son datos interesantes ya que como sabemos, cada tipo de vesícula endocítica provee un microambiente distinto en su interior. El ambiente encontrado en los endosomas tempranos consta entre otras características, de un pH entre los 6.5 y 6, por lo que las condiciones de este compartimiento difieren ligeramente del ambiente exterior de la célula; sin embargo, además de las diferencias de pH entre los compartimientos endocíticos también existen diferencias en las concentraciones de iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  (Saito, Hanson et al. 2007; Galione, Evans et al. 2009; Grabe and Oster 2001) Hasta ahora estas diferencias son poco comprendidas debido a la dificultad de su estudio; sin embargo, actualmente se conocen al menos 2 tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que sólo funcionen en el interior de endosomas sacando al ion  $\text{Ca}^{2+}$  de la vesícula, la actividad del canal incrementa conforme el pH disminuye (Saito, Hanson et al. 2007). Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  es suficiente para llevar al desnudamiento de la partícula (Chemello, Aristimuno et al. 2002), y aún no se ha logrado determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de cada vesícula endocítica en MA104. Experimentos llevados a cabo en el laboratorio han mostrado que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico no es suficiente para provocar el desnudamiento de la partícula viral (Pando, Isa et al. 2002), por lo que podemos deducir que posiblemente la baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas no es suficiente para el desnudamiento de RV, sino que además es necesaria la disminución del pH en la ruta endosomal o incluso cambios conformacionales ocasionados por la unión del virus con sus receptores para que se lleve a cabo el proceso de desnudamiento.

Por otra parte, también se tiene conocimiento de que el citoesqueleto de la célula es de gran importancia para la formación de la vesícula endocítica, así como para el transporte vesicular dentro de la célula (Ohashi, Tanabe et al. 2011). En el caso de los filamentos de actina se sabe que durante la endocitosis mediada por clatrina tienen la función de controlar las deformaciones que se dan en la membrana de la célula para la formación de la vesícula endocítica (Ohashi, Tanabe et al. 2011). Por otra parte, recientemente se ha

caracterizado que los microfilamentos tienen un papel importante en la regulación del transporte desde el endosoma temprano hacia la vía degradativa o la vía reciclativa (Ohashi, Tanabe et al. 2011), mientras que la red de microtúbulos forma los rieles por los que el transporte vesicular se lleva a cabo con la ayuda de motores moleculares como dinamina (Honda 2006; Tooney, Agrez et al. 1993). Tanto el papel de las redes de actina como de tubulina son importantes para las vías de endocitosis conocidas en la actualidad. De manera sorprendente nuestros datos no mostraron ningún papel del citoesqueleto en la entrada de RV. Esto puede deberse a que la inhibición en la polimerización de actina y de tubulina no fue al 100% por lo que no fuimos capaces de inhibir todos los procesos que dependen de éstas; desafortunadamente es prácticamente imposible eliminar al 100% el citoesqueleto, debido a que la inhibición total del citoesqueleto lleva a la muerte de la célula.

### **Distribución organelo-citosol de proteínas y partículas virales**

La distribución de partículas y proteínas virales en el interior de la célula a lo largo de la infección es aún pobremente entendida. Al estudiar la localización de las proteínas virales, lo primero que observamos fue que las proteínas de cápside viral se encuentran en su mayoría en la fracción no soluble durante todo el ciclo de infección, de manera congruente observamos que las proteínas observadas en esta fracción se encuentran formando TLPs, y esto se da aún desde tiempos de infección muy tempranos, por lo que podríamos pensar que las DLPs recién armadas son reclutadas rápidamente hacia el RE para la formación de nuevas TLPs. Finalmente mediante ensayos de progenie viral determinamos que las TLPs se encuentran prácticamente en su totalidad en la fracción no soluble aún en tiempos tardíos de la infección de RV, mientras que no logramos ver nunca la presencia de DLPs en la fracción citoplásmica, lo que se puede explicar si: 1) la concentración de DLPs libres en citosol se mantiene en todo momento muy bajas y prácticamente todas las DLPs recién sintetizadas se internalizan al RE a finalizar la

morfogénesis; o 2) si las DLPs citoplásmicas se encuentran anclados a algún tipo de membrana, o con el citoesqueleto de la célula.

Sabemos que las etapas finales de la morfogénesis viral se realizan en el lumen del retículo endoplásmico, ya que este organelo es el sitio en donde se almacena el  $\text{Ca}^{2+}$  y mantiene un pH prácticamente neutro, lo que provee un ambiente favorable para el ensamblaje de la última capa de la partícula viral. Por otro lado, a pesar de que el citoplasma celular mantiene un pH neutro, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantiene en niveles bajos, por lo que se espera que las TLPs se mantengan en un reservorio que les dé el ambiente necesario para mantener sus tres capas intactas, por lo que es lógico encontrar a las partículas infecciosas en las fracciones no solubles. Por otra parte, se ha comprobado que durante la infección con RV, la proteína NSP4 descompensa el metabolismo de  $\text{Ca}^{2+}$  provocando el vaciamiento de las pozas internas de  $\text{Ca}^{2+}$  y por consiguiente el aumento de este ión en el citoplasma celular (Hyser, Collinson-Pautz et al. 2010), por lo que en tiempos tardíos de la infección el citoplasma también debería ser un sitio en donde las TLPs podrían mantenerse sin perder la última capa de su cápside, sin embargo, en este trabajo demostramos que las partículas infecciosas se mantienen durante todo el ciclo de infección en la fase no soluble. Esto puede ser debido a que las TLPs se mantienen en el RE o asociadas a membranas o citoesqueleto, tal y como se ha reportado para otros virus como poxvirus, asfavirus, iridovirus y poliovirus entre otros (Novoa, Calderita et al. 2005).

## **Replicación de RV y sub-partículas virales**

Aunque se ha estudiado durante muchos años los procesos de morfogénesis, replicación y empaquetamiento del genoma viral, su estudio ha sido difícil debido a que estos procesos parecen ser interdependientes, por lo que aún no se comprende con detalle cómo es que se llevan a cabo. Recientemente se han descrito dos hipótesis para tratar de explicar cómo es que se dan estos procesos: la primera hipótesis propone que la replicación comienza con la formación de precores constituidos por VP1 y VP3 asociados al mRNA viral. Una vez

que se da esta primera interacción, se lleva a cabo la “selección” (assortment) de cada uno de los segmentos mediante el reconocimiento entre UTR presentes en cada uno de los mRNA virales, una vez que la selección de los segmentos está lista, VP2 interacciona con VP1 y VP3 permitiendo el empaquetamiento del genoma y ya empaquetado se replica cada segmento; la segunda hipótesis propone que la replicación comienza con la interacción de las proteínas VP1, VP2 y VP3, lo que lleva a la formación de una SLP vacía, la cual posteriormente interactúa con hebras de cada uno de los 11 distintos segmentos de mRNA viral, las cuales se internalizan al momento en que se realiza la replicación del genoma (McDonald and Patton 2011). Estas dos hipótesis parten del supuesto de que el dsRNA nunca se encuentra libre en el citoplasma celular; sin embargo, los resultados mostrados aquí y resultados obtenidos recientemente por el Dr. Rojas en el laboratorio demuestran la existencia de dsRNA citoplásmico (Rojas, Arias et al. 2010), aunque hasta ahora no podemos asegurar que este dsRNA citoplásmico se encuentra interactuando o no con alguna proteína o complejo proteico. En este trabajo también mostramos que la mayoría del dsRNA citosólico baja a la fracción insoluble después de pasar la fracción citoplásmica por un colchón de sacarosa, esto puede explicarse al suponer que realmente el dsRNA citoplásmico se encuentra interactuando con un complejo de proteínas, presumiblemente con un posible intermediario de replicación encontrado en esta misma fracción. Con estos datos podríamos proponer que no es necesaria la formación del core del virus para la síntesis de RNA. Por otro lado también encontramos mRNA en el pellet de la fracción citoplásmica, lo que se podría explicar pensando en que es mensajero viral interactuando con ribosomas o posiblemente con los pre-complejos de replicación.

## Conclusiones

- Aunque hace falta un estudio más detallado es probable que el inicio de la transcripción se lleve a cabo aproximadamente a los 20min de infección, dentro de vesículas endocíticas.
- El virus sale de la vía endocítica entre los 40 y 60 minutos de infección.
- Por medio de rtPCR en tiempo real fuimos capaces de detectar dsRNA citosólico.
- EEA1 y Rab5 son necesarias para la entrada de RV, por lo que pensamos que el virus necesita llegar hasta el endosoma temprano para su escape al citoplasma.
- El citoesqueleto no tiene un papel esencial durante la entrada viral.
- El observar las DLPs y TLPs en la fracción no soluble, así como la observación de partículas infecciosas en mayor concentración en dicha fracción son muestras de que estas partículas se encuentran dentro de algún organelo o asociado a alguna membrana o estructura celular durante todo el ciclo de infección.
- Las proteínas del core de la cápside forman un complejo en el citoplasma, posiblemente este complejo entre VP1, VP2 y VP3 forme uno de los intermediarios de la replicación de RV.

## Referencias

- Arias, C. F., P. Isa, et al. (2002). "Molecular biology of rotavirus cell entry." Arch Med Res **33**(4): 356-361.
- Arnoldi, F., M. Campagna, et al. (2007). "Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2." J Virol **81**(5): 2128-2137.
- Ayala-Breton, C., M. Arias, et al. (2009). "Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference." J Virol **83**(17): 8819-8831.
- Bagci, S., A. M. Eis-Hubinger, et al. (2010). "Clinical characteristics of viral intestinal infection in preterm and term neonates." Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
- Baker, M. and B. V. Prasad (2010). "Rotavirus Cell Entry." Curr Top Microbiol Immunol.
- Ball, J. M., D. M. Mitchell, et al. (2005). "Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin." Viral Immunol **18**(1): 27-40.
- Bernardi, K. M., M. L. Forster, et al. (2008). "Derlin-1 facilitates the retro-translocation of cholera toxin." Mol Biol Cell **19**(3): 877-884.
- Cabral-Romero, C. and L. Padilla-Noriega (2006). "Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(6): 603-611.
- Carreno-Torres, J. J., M. Gutierrez, et al. (2010). "Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection." Virology **7**: 350.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Chemello, M. E., O. C. Aristimuno, et al. (2002). "Requirement for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> gradient during entry of rotavirus into MA104 cells." J Virol **76**(24): 13083-13087.
- Cheung, W., M. Gill, et al. (2010). "Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication." J Virol **84**(13): 6782-6798.
- Estes, M. K. and J. Cohen (1989). "Rotavirus gene structure and function." Microbiol Rev **53**(4): 410-449.
- Galione, A., A. M. Evans, et al. (2009). "The acid test: the discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca<sup>2+</sup> release channels." Pflugers Arch **458**(5): 869-876.
- Gallegos, C. O. and J. T. Patton (1989). "Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles." Virology **172**(2): 616-627.
- Ghigo, E. (2010). "A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells?" Intervirology **53**(5): 274-283.
- Grabe, M. and G. Oster (2001). "Regulation of organelle acidity." J Gen Physiol **117**(4): 329-344.
- Gutierrez, M., P. Isa, et al. (2010). "Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis." J Virol **84**(18): 9161-9169.
- Haas, A. (2007). "The phagosome: compartment with a license to kill." Traffic **8**(4): 311-330.
- Helmberger-Jones, M. and J. T. Patton (1986). "Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11." Virology **155**(2): 655-665.
- Honda, A. (2006). "[Roles of tubulin in endocytosis: their contribution to synaptic vesicle recycling]." Seikagaku **78**(9): 874-878.
- Hutchinson, E. C., J. C. von Kirchbach, et al. (2010). "Genome packaging in influenza A virus." J Gen Virol **91**(Pt 2): 313-328.
- Hyser, J. M., M. R. Collinson-Pautz, et al. (2010). "Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity." MBio **1**(5).
- Isa, P., C. F. Arias, et al. (2006). "Role of sialic acids in rotavirus infection." Glycoconj J **23**(1-2): 27-37.

- Jayaram, H., M. K. Estes, et al. (2004). "Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication." *Virus Res* **101**(1): 67-81.
- Knipe, D. M. (2006). *Field's Virology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lawton, J. A., M. K. Estes, et al. (1997). "Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles." *Nat Struct Biol* **4**(2): 118-121.
- Li, W., E. Manktelow, et al. (2010). "Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions." *Nucleic Acids Res* **38**(21): 7718-7735.
- Luque, D., I. Saugar, et al. (2009). "Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus." *J Mol Biol* **386**(3): 891-901.
- Mansell, E. A. and J. T. Patton (1990). "Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity." *J Virol* **64**(10): 4988-4996.
- Marsh, M. and A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." *Cell* **124**(4): 729-740.
- Maruri-Avidal, L., S. Lopez, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles." *J Virol* **82**(11): 5368-5380.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8): 603-612.
- McClain, B., E. Settembre, et al. (2010). "X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution." *J Mol Biol* **397**(2): 587-599.
- McDonald, S. M. and J. T. Patton (2011). "Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome." *Trends Microbiol* **19**(3): 136-144.
- Mindich, L. (2004). "Packaging, replication and recombination of the segmented genome of bacteriophage Phi6 and its relatives." *Virus Res* **101**(1): 83-92.
- Montero, H., C. F. Arias, et al. (2006). "Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis." *J Virol* **80**(18): 9031-9038.
- Novoa, R. R., G. Calderita, et al. (2005). "Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis." *Biol Cell* **97**(2): 147-172.
- Ogden, K. M., H. N. Ramanathan, et al. (2011). "Residues of the rotavirus RNA-dependent RNA polymerase template entry tunnel that mediate RNA recognition and genome replication." *J Virol* **85**(5): 1958-1969.
- Ohashi, E., K. Tanabe, et al. (2011). "Receptor Sorting within Endosomal Trafficking Pathway Is Facilitated by Dynamic Actin Filaments." *PLoS One* **6**(5): e19942.
- Pando, V., P. Isa, et al. (2002). "Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection." *Virology* **295**(1): 190-200.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 185-194.
- Patton, J. T., R. Vasquez-Del Carpio, et al. (2004). "Replication and transcription of the rotavirus genome." *Curr Pharm Des* **10**(30): 3769-3777.
- Pelkmans, L. and A. Helenius (2002). "Endocytosis via caveolae." *Traffic* **3**(5): 311-320.
- Pesavento, J. B., S. E. Crawford, et al. (2006). "Rotavirus proteins: structure and assembly." *Curr Top Microbiol Immunol* **309**: 189-219.
- Prasad, B. V., R. Rothnagel, et al. (1996). "Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus." *Nature* **382**(6590): 471-473.
- Rojas, M., C. F. Arias, et al. (2010). "Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection." *J Virol* **84**(20): 10457-10466.
- Ruiz, M. C., J. Cohen, et al. (2000). "Role of Ca<sup>2+</sup> in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections." *Cell Calcium* **28**(3): 137-149.

- Saito, M., P. I. Hanson, et al. (2007). "Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes." J Biol Chem **282**(37): 27327-27333.
- Sandino, A. M., M. Jashes, et al. (1986). "Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription." J Virol **60**(2): 797-802.
- Scita, G. and P. P. Di Fiore (2010). "The endocytic matrix." Nature **463**(7280): 464-473.
- Schnatwinkel, C., S. Christoforidis, et al. (2004). "The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms." PLoS Biol **2**(9): E261.
- Schuck, P., Z. Taraporewala, et al. (2001). "Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes." J Biol Chem **276**(13): 9679-9687.
- Seaman, M. N. (2008). "Endosome protein sorting: motifs and machinery." Cell Mol Life Sci **65**(18): 2842-2858.
- Sieczkarski, S. B. and G. R. Whittaker (2002). "Dissecting virus entry via endocytosis." J Gen Virol **83**(Pt 7): 1535-1545.
- Swanson, J. A. and C. Watts (1995). "Macropinocytosis." Trends Cell Biol **5**(11): 424-428.
- Takei, K. and V. Haucke (2001). "Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger." Trends Cell Biol **11**(9): 385-391.
- Tooney, P. A., M. V. Agrez, et al. (1993). "A re-examination of the molecular basis of cell movement." Immunol Cell Biol **71 ( Pt 2)**: 131-139.
- Tortorici, M. A., T. J. Broering, et al. (2003). "Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus." J Biol Chem **278**(35): 32673-32682.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-852.
- Vende, P., Z. F. Taraporewala, et al. (2002). "RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA." J Virol **76**(10): 5291-5299.