



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR
DE LA PROTEÍNA NSP1 DE ROTAVIRUS”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA
LAURA MARTÍNEZ ALVAREZ

TUTOR DE TESIS
DR. LUIS PADILLA NORIEGA



MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis fue financiada parcialmente por los proyectos:

51029-Z del fondo sectorial de investigación para la educación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

IN224809 e IN210906 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada con el registro 131909, durante el período de agosto de 2009 a junio de 2011 (4 semestres del 2009-2 al 2011-1).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los doctores Carolina Piña Vázquez, técnico anteriormente adscrita al laboratorio, y Renato León Rodríguez, técnico académico actualmente adscrito al laboratorio, por el apoyo técnico brindado durante la realización de esta tesis.

Agradezco al Dr. Luis Padilla Noriega por su cuidadosa asesoría y observaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a las doctoras Imelda López Villaseñor y Rosa Navarro González, miembros del Comité Tutoral, por sus valiosos comentarios durante la realización de esta tesis.

Agradezco a los miembros del Jurado, las doctoras Herminia Loza Tavera, Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Nuria Sánchez Puig y Alejandra Hernández Santoyo, por sus valiosos comentarios durante la revisión de esta tesis.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	4
Lista de Figuras.....	6
Lista de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Introducción.....	10
Antecedentes.....	27
Justificación.....	41
Hipótesis.....	42
Objetivos.....	43
Metodología.....	44
Resultados.....	60
Discusión.....	89
Conclusiones.....	101
Perspectivas.....	102
Apéndice de Soluciones.....	103
Referencias.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
C	Citosina
CLL	clasto-lactacystina- β -lactona
C-terminal	Extremo carboxilo-terminal
DI	Defectiva interferente (<i>defective interfering</i>)
DLP	Partícula de doble capa (<i>double-layered particle</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena (<i>double-stranded RNA</i>)
EMC	Encefalomiocarditis
G	Guanina
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
hpi	Horas post-infección
hpt	Horas post-transfección
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRF	Factor de respuesta a interferón (<i>Interferon response factor</i>)
ISG	Gen estimulado por interferón (<i>Interferon-stimulated gen</i>)
IR	Intermediario de replicación
ISRE	Elemento de respuesta estimulado por interferón (<i>Interferon stimulated response element</i>)
kDa	kiloDalton

MEM	Medio modificado de Eagle (<i>modified Eagle's medium</i>)
MeOH	Metanol
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
mRNALuc	RNA mensajero de luciferasa
mRNARRV	RNA mensajero total de RRV
NSP	Proteína no-estructural (<i>non-structural protein</i>)
N-terminal	Extremo amino-terminal
PBS	Amortiguador Fosfato Salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
rNSP1	Proteína NSP1 recombinante
RRV	<i>Rhesus Rotavirus</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SFB	Suero fetal bovino
T	Timina
TBS	Amortiguador Tris salino (<i>Tris buffered Ssline</i>)
TLP	Partícula de triple capa (<i>Triple-layered particle</i>)
U	Uracilo
UTR	Región no-traducida (<i>untranslated region</i>)
VP	Proteína viral (<i>viral protein</i>)
VV	Virus Vaccinia
WB	Western-blot

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Micrografía electrónica de rotavirus visualizados mediante tinción negativa.....	10
2	Electroforesis de los 11 segmentos de dsRNA que constituyen el genoma de los rotavirus.....	12
3	Representación esquemática del virión de rotavirus.....	12
4	Modelo de una DLP transcripcionalmente activa.....	14
5	Representación esquemática de la organización del genoma dentro de la nucleocápside de rotavirus.....	14
6	Características principales de la estructura de los genes de rotavirus.....	15
7	Rotavirus infecta los enterocitos maduros en las microvellosidades del intestino delgado.....	21
8	Cinética de la transcripción y replicación del genoma de rotavirus..	23
9	Representación esquemática del ciclo replicativo de rotavirus.....	25
10	Representación esquemática de la estructura de NSP1.....	27
11	NSP1 se localiza dispersa en el citoplasma.....	28
12	Representación esquemática de la vía de IFN.....	30
13	Esquema del proceso de ubiquitinación.....	34
14	Dominio tipo RING putativo de NSP1.....	45
15	Representación esquemática de la vía de señalización de PI3K.....	38
16	Modelo de los mecanismos por los que NSP1 ejerce su función	40

	pro-viral.....	
17	Representación esquemática del sistema de expresión VOTE.....	51
18	Esquema general del procesamiento de células para su análisis mediante inmunofluorescencia.....	53
19	Esquema general de la detección de proteínas mediante Western-blot.....	56
20	Distribución general de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV.....	60
21	Cinética de expresión de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV.....	62
22	Cinética de la distribución intracelular de NSP1.....	63
23	Cinética de expresión de NSP1.....	65
24	Alto nivel de expresión de NSP1 correlaciona con distribución alterada de proteínas virales.....	66
25	Esquema de factores que pueden afectar la distribución de NSP1..	68
26	Sincronización de la infección con el anticuerpo neutralizante 4F8.	69
27	Infectividad residual en células MA-104 infectadas con RRV luego del tratamiento con el anticuerpo monoclonal 4F8.....	70
28	Efecto de la MOI y de la sincronización de la infección sobre el nivel de expresión de NSP1.....	71
29	VP2 como marcador de replicación defectiva en células MA-104 infectadas con RRV.....	73
30	La distribución de VP2 no es un marcador de replicación defectiva en células MA-104 infectadas con RRV.....	75
31	Relación entre la degradación de lamina como marcador de	77

	apoptosis y la expresión de NSP1.....	
32	Evaluación del inhibidor del proteasoma CLL.....	79
33	Efecto del proteasoma sobre la distribución de NSP1.....	80
34	Efecto del proteasoma sobre el nivel de expresión de NSP1.....	81
35	Evaluación de la calidad del mRNA _{RRV}	82
36	Efecto sobre la expresión de NSP1 de la transfección de mRNA _{RRV} durante las fases tempranas de la infección de RRV.....	84
37	Efecto de la transfección de mRNA _{RRV} sobre la expresión de NSP1.....	86
38	Distribución intracelular de NSP1 fuera del contexto de la infección viral.....	88

LISTA DE TABLAS

Figura		Pág.
1	Diferencias entre cepas en la inhibición de IFN tipo I mediada por NSP1.....	33

RESUMEN

El genoma de los rotavirus (RV) consta de 11 segmentos de RNA de doble cadena que codifican 12 proteínas: 6 estructurales (VP1-4, 6 y 7) y las otras 6 no-estructurales (NSP1-6). La replicación del genoma y el inicio de la morfogénesis del virión ocurre en estructuras llamadas viroplasma (VPs). NSP1 une específicamente los RNA mensajeros virales y es antagonista de la vía de interferón (IFN), ya que canaliza a degradación por el proteasoma a varios factores regulatorios de IFN. En este estudio determinamos la cinética de la distribución intracelular y la expresión de NSP1 a lo largo de la infección por RV. En células MA104 infectadas con el RV de simio RRV, NSP1 se distribuye difusa en el citoplasma con un patrón punteado y perinuclear. Antes de las 12 horas post-infección su expresión es baja, pero en la fase tardía, coincidentemente con la meseta de la producción de virus infecciosos, se incrementa su expresión en una fracción de células de 30-40%. A partir de este tiempo NSP1 también puede formar cúmulos en el citoplasma, similares pero de mayores dimensiones que el patrón punteado. NSP1 recombinante expresada mediante el sistema del virus vaccinia se distribuye de manera homogénea y difusa en el citoplasma, y también forma cúmulos que, a diferencia de infecciones con RV, no se concentran en la región perinuclear, lo que sugiere que esta ubicación es determinada por componentes virales. En células infectadas con RRV encontramos que la alta expresión de NSP1 correlaciona con alteraciones en la distribución las proteínas virales de VPs: NSP2, VP6 y VP2. Investigamos qué factores correlacionan con el nivel de expresión de NSP1 y encontramos que éste se incrementa de manera proporcional a la multiplicidad de infección. En conjunto con estudios previos, nuestros resultados indican que NSP1 autoregula su baja expresión durante la fase productiva del ciclo replicativo viral, pero frecuentemente es incapaz de mantener esta regulación al declinar la producción viral.

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género Rotavirus constituyen la causa más común de diarrea infecciosa en infantes y niños pequeños. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, afecta principalmente a niños menores de 5 años, especialmente entre los 6 meses y dos años de edad. Rotavirus es el agente responsable de aproximadamente 527 000 muertes anuales en el mundo y es la causa de más de 2 millones de hospitalizaciones por deshidratación severa al año [1].

El nombre de rotavirus hace referencia a la apariencia característica de la partícula viral, que semeja una rueda (del latín *rota*, rueda) [2] (Fig. 1). Pertenecen a la familia de los *Reoviridae*, que se caracteriza porque sus miembros poseen genomas de RNA de doble cadena (dsRNA) y comparten características morfológicas.

De acuerdo a sus características serológicas los rotavirus pueden clasificarse en 7 grupos (A-G) [3]. Los grupos A, B y C

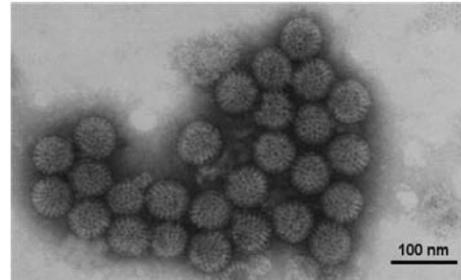


Figura 1. Micrografía electrónica de rotavirus visualizados mediante tinción negativa. Imagen obtenida por el profesor M. Stewart McNulty de la Universidad de la Reina en Belfast. Barra, 100 nm.

infectan tanto a humanos como a animales, mientras que los grupos restantes (D-G) se han encontrado sólo en animales. Las cepas pertenecientes al grupo A son la causa principal de diarrea en infantes.

Así mismo, los miembros de un grupo determinado pueden clasificarse en serotipos o genotipos, con base en los antígenos de la capa externa VP4 y VP7. Los serotipos son determinados por ensayos de neutralización con sueros policlonales, mientras que los genotipos se determinan por análisis de secuencia o ensayos de hibridación [4]. Recientemente se amplió la clasificación de genotipos a todos los 11 genes virales por secuenciación de los genomas completos de numerosas cepas de rotavirus [5].

PROPIEDADES DEL GENOMA Y ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

El genoma de los rotavirus está conformado por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) los cuales codifican 12 proteínas [6] (Fig. 2). Todos los segmentos son monocistrónicos, con excepción del segmento 11. Gracias a la naturaleza segmentada de su genoma, los rotavirus pueden sufrir rearrreglo genético cuando dos cepas diferentes infectan una misma célula, pero este fenómeno está restringido únicamente a las cepas de un mismo grupo. Las proteínas virales codificadas en el genoma de rotavirus pueden clasificarse en proteínas estructurales, que son aquellas presentes en la partícula madura, y proteínas no estructurales, que se encuentran presentes en células infectadas pero no forman parte de la partícula madura, siendo necesarias para procesos como la replicación, morfogénesis y patogénesis virales. Las proteínas estructurales se nombran con el prefijo VP (de *viral protein*) seguido de un número de acuerdo al peso molecular de la proteína: VP1-8, donde 1

corresponde a la proteína de mayor peso molecular y 8 a la de menor peso. Las proteínas VP5* y VP8* no son productos primarios de traducción, sino son productos de corte proteolítico de VP4. Las proteínas no estructurales llevan el prefijo NSP (de *non-structural protein*) seguido de un número, de 1-6, que también refleja su peso molecular [7] (Fig. 2).

El virión maduro es un icosaedro con simetría T=13, de entre 65 y 75 nm de diámetro, carente de envoltura lipídica y está compuesto por tres capas de proteínas [6] (Fig. 3). La capa más interna consiste en 120 copias de la proteína VP2 formando dímeros. Cinco dímeros de VP2 constituyen cada uno de los 12 pentámeros de la nucleocápside icosaédrica, de manera que esta contiene en total 60 dímeros [8] (Fig. 3, verde). La nucleocápside contiene al genoma viral formando complejos con las proteínas VP1 y VP3, que se localizan en cada uno de los 12 vértices en el eje de simetría 5 del icosaedro [9].

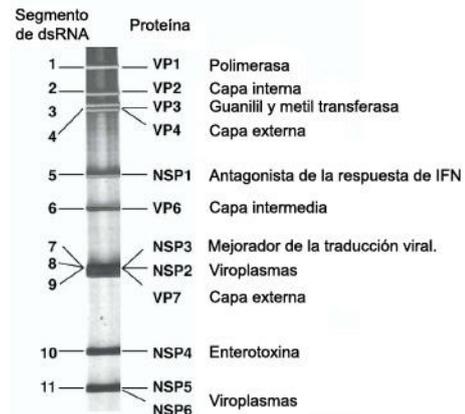


Figura 2. Electroforesis de los 11 segmentos de dsRNA que constituyen el genoma de los rotavirus. Los segmentos se indican con números al lado izquierdo del gel, y las proteínas que codifican se indican del lado derecho. Imagen adaptada de Greenberg y Estes [48].

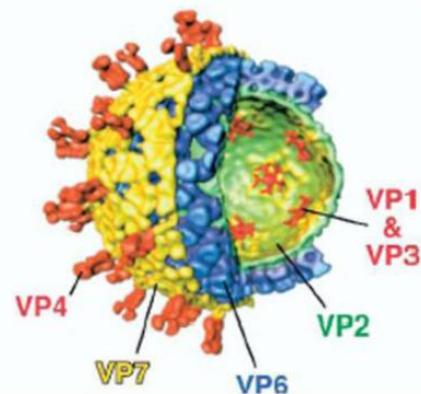


Figura 3. Representación esquemática del virión de rotavirus. Se muestran las tres capas que conforman al virión maduro. Capa externa: VP7 (amarillo) y VP4 (naranja); capa intermedia: VP6 (azul); nucleocápside: VP2 (verde), VP1 y VP3 (rojo). Extraído de Greenberg y Estes [48].

La capa intermedia está formada por 780 unidades de la proteína VP6 formando trímeros (Fig. 3, azul). La antigenicidad de VP6 se emplea para la clasificación de rotavirus en grupos [6].

La capa externa está compuesta de 780 moléculas de la glicoproteína VP7 y 120 de la proteína VP4 [6, 10]. VP7 se encuentra formando trímeros e interacciona con los trímeros formados por VP6. Dímeros de VP4 forman 60 espículas que sobresalen de la superficie de la capa externa (Fig. 3, VP7 en amarillo, VP4 en rojo). Cada dímero de VP4 interacciona con VP7 y VP6, por lo que podría ser importante para mantener la geometría correcta entre las capas externa e interna [6, 11].

Interesantemente, las partículas virales de 2 capas (DLPs, del inglés *double-layered particles*) funcionan como una máquina capaz de transcribir el genoma viral, produciendo los 11 mRNAs virales. Una característica de las DLPs es la presencia de 132 canales que participan en la importación de metabolitos requeridos para la transcripción y en la exportación de RNA mensajero (mRNA) [12, 13] (Fig. 4). Dependiendo de su tamaño y posición pueden distinguirse tres tipos de canales. Los canales tipo I se localizan en el centro de cada uno de los 12 pentámeros de VP2 y conducen hacia las enzimas que catalizan la síntesis de los mensajeros virales (VP1 y VP3) [14-16].

Una partícula viral con sus tres capas protéicas se denomina TLP (*triple-layered particle*). La infectividad de la partícula depende de la presencia de la capa externa y se requiere Ca^{2+} para su estabilidad, puesto que la proteína VP7 de la capa externa requiere interactuar con Ca^{2+} para formar trímeros y tratamiento con agentes quelantes ocasiona la remoción de la capa externa, generando DLPs [13]. La remoción de la capa intermedia de las DLPs produce partículas de una sola capa, o SLPs (del inglés *single-layered particle*) [13].

Los 11 segmentos de dsRNA que conforman el genoma de los rotavirus están contenidos dentro de la nucleocápside (compuesta de VP1, VP2 y VP3). El genoma está empaquetado de manera ordenada en su interfase con VP2, sin embargo hacia el centro de la partícula viral no presenta ordenamiento distinguible por criomicroscopía electrónica [9, 17] (Fig. 5). Comparaciones de la secuencia de los segmentos del genoma de varias cepas de

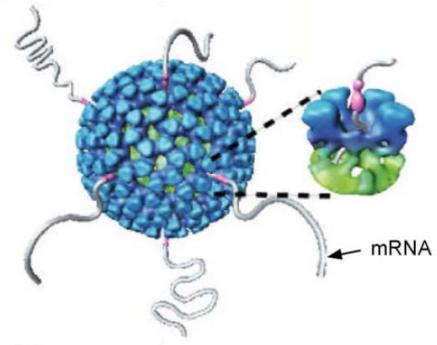


Figura 4. Modelo de una DLP transcripcionalmente activa. La transcripción endógena resulta en la liberación simultánea del mRNA transcrito a partir de los canales ubicados en los ejes de simetría 5 de la partícula de doble capa. Imagen extraída de Jayaram *et al.* [17].

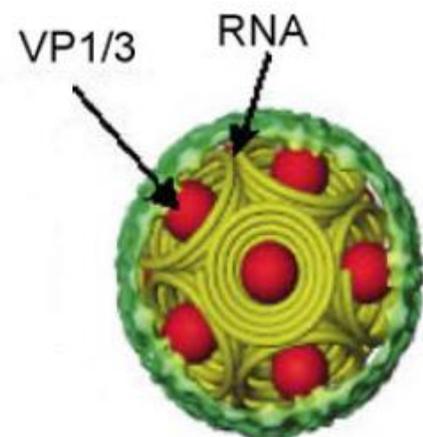


Figura 5. Representación esquemática de la organización del genoma dentro de la nucleocápside de rotavirus. Imagen extraída de Jayaram *et al.* [17].

rotavirus revelan que en general existe mayor homología en los extremos 5' y 3' de las regiones no-traducidas (UTRs, del inglés *untranslated region*) que en los marcos abiertos de lectura. La hebra con sentido (hebra (+)) de cada segmento del genoma de rotavirus posee:

- una 5'-guanina metilada (*cap*, con secuencia $m^7GpppG^{(m)}GPy$)
- secuencias no codificantes conservadas en el extremo 5'
- un marco abierto de lectura (ORF)
- secuencias no-codificantes en el extremo 3' que finalizan con dos citocinas
- secuencia consenso 5'-UGUGACC-3' en el extremo 3', importante para la replicación del genoma y la expresión de genes

Las secuencias consenso en los extremos son importantes para la replicación, la traducción y el empaquetamiento del genoma en el virión. Además, el genoma de rotavirus es rico en A y U [18-20]. Estos elementos comunes entre los segmentos que conforman el genoma de rotavirus se esquematizan en la Fig. 6.

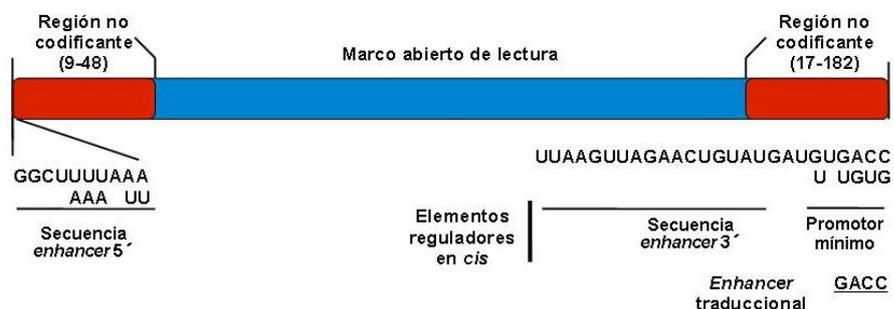


Figura 6. Características principales de la estructura de los genes de rotavirus. Todos los genes de rotavirus carecen de secuencia de poli(A) en su extremo 3', son ricos en A + U y contienen secuencias conservadas en sus extremos 5' y 3'. Se predice que las secuencias no-codificantes 5'- y 3'- forman estructuras secundarias que podrían actuar como elementos en *cis*, además, se propone interaccionan entre sí favoreciendo la circularización de los mRNAs. La penúltima secuencia 5'-GACC-3' es un *enhancer* de la traducción. Imagen adaptada de Estes [4].

Antes de abordar el ciclo replicativo se dará una breve descripción de la función y características principales de las proteínas de rotavirus.

FUNCIÓN GENERAL DE LAS PROTEÍNAS VIRALES

Las proteínas de la nucleocápside son VP1, VP2 y VP3. Son proteínas estructurales que poseen afinidad por RNA de cadena sencilla (ssRNA) y participan en la replicación y transcripción virales.

Numerosos estudios sugieren que VP1 es la RNA polimerasa dependiente de RNA del virus [16, 21, 22], y participa tanto en la replicación del genoma de rotavirus como en la síntesis de mensajeros virales. VP1 requiere de VP2 para su actividad como replicasa [21] y es la única proteína estructural que une de manera secuencia-específica al RNA viral al reconocer el extremo 3' de los mensajeros [23].

VP2 es el componente más abundante de la nucleocápside e interacciona de manera no-específica con el dsRNA al interior. Así mismo, existen estudios que muestran que el extremo N-terminal de VP2 interacciona con VP1 y VP3 [24, 25]. VP2 es la única proteína de rotavirus con capacidad de auto-ensamblarse en una estructura icosaédrica y esta observación sugiere que es la proteína que posee los determinantes requeridos para dirigir el ensamblaje de las otras proteínas virales [17].

VP3 es una guanilil- y metil-transferasa requerida para la producción de los transcritos con *cap* [14, 26].

VP1 y VP3 están presentes como un heterodímero anclado a la superficie interna de la capa de VP2, adyacentes a los 12 canales tipo I en esta capa [9].

Se ha sugerido que esta organización particular de la nucleocápside cumple el

doble propósito de posicionar adecuadamente al complejo que lleva a cabo la transcripción y de organizar el genoma, con la finalidad de facilitar la transcripción endógena [17].

VP6 es la proteína constituyente de la capa intermedia y la más abundante de las proteínas de rotavirus. Al parecer, su función es la de integrar las dos principales funciones del virus: entrada a la célula y transcripción endógena, logrando esto a través de sus interacciones con las proteínas de la capa externa y la capa interna. Es una proteína hidrofóbica, altamente antigénica e inmunogénica [17].

Las otras proteínas estructurales son VP4 y VP7. VP4 es componente de la capa externa y está implicada en la adhesión del virus a la célula, en su internalización, hemaglutinación, neutralización y virulencia [4]. La ruptura proteolítica de VP4 incrementa la infectividad viral y facilita la entrada del virus [27].

VP7 es una glicoproteína localizada en la capa externa del virión, es la segunda más abundante de las proteínas virales. Se ha propuesto que es el mediador clave en la pérdida de la capa externa durante la internalización del virión a la célula en un proceso dependiente de calcio. Además, modula la función de VP4 durante la adhesión del virus a la célula y la entrada al citoplasma [17].

Las proteínas no estructurales están implicadas en múltiples etapas del ciclo viral. Sus propiedades sugieren que son parte de los complejos de replicación, ya sea que funcionen como chaperonas para transportar RNA o proteínas a los sitios de replicación, traducción y ensamblaje, o que participen en el empaquetamiento del genoma [4]. Todas las proteínas no-estructurales (a

excepción de NSP4) interaccionan con ácidos nucleicos, la mayoría posee carga positiva y se encuentran presentes en partículas subvirales con actividad replicasa [4].

NSP1 es la menos expresada de las proteínas de rotavirus y posee la característica particular de que su longitud varía entre distintas cepas (486-495 residuos). Une específicamente a los mRNA virales, reconociendo su extremo 5' [28]. Es la menos conservada de las proteínas de rotavirus, en especial en el extremo carboxilo terminal (C-terminal). NSP1 presenta en su extremo amino terminal (N-terminal) un dominio de unión a zinc tipo RING, altamente conservado, que se ha reportado en la proteína homóloga de todos los rotavirus del grupo A y C descritos hasta la fecha [29]. Recientemente se ha relacionado a NSP1 como antagonista de la respuesta antiviral celular, al inhibir la vía de señalización por interferón (IFN) tipo I [30, 31].

NSP3 reconoce y une la secuencia consenso en el extremo 3' de los transcritos de rotavirus mediante su extremo N-terminal [32, 33]. Su extremo C-terminal interacciona con el factor de iniciación de la traducción eIF4G, que es requerido para reclutar la maquinaria traduccional del hospedero. NSP3 se une a eIF4G en el mismo dominio reconocido por PABP (del inglés *poly-A binding protein*), que es la proteína que une la cola de poli(A) de los mensajeros celulares [34, 35] y es capaz de desplazar a PABP de su unión a eIF4G, por lo que se ha propuesto que es a través de este mecanismo por el que NSP3 inhibe la síntesis de proteínas celulares. Debido a que NSP3 se une a los mRNA virales en su extremo 3' y a eIF4G se ha propuesto que es capaz de incrementar la traducción de los mensajeros virales, a la vez que elimina la necesidad de los mensajeros virales de estar poliadenilados en su extremo 3'. NSP3 está

distribuida en el citoplasma con un patrón filamentoso y co-purifica con la matriz del citoesqueleto en ensayos de fraccionamiento celular, lo que sugiere que podría estar asociada con el citoesqueleto [36].

Trabajos *in vitro* e *in vivo* han implicado a las proteínas NSP2 y NSP5 en la replicación y empaquetamiento del genoma. Ambas colocalizan en los viroplasmos, que son estructuras que constituyen “fábricas virales” donde se lleva a cabo el empaquetamiento, la replicación del genoma viral y el ensamblaje de DLPs [37, 38]. Estudios realizados con NSP2 recombinante muestran que forma octámeros con forma de dona y tiene actividades de nucleótido trifosfatasa (NTPasa), de unión a RNA [39] y actividad desestabilizadora de hélice [40]. En base a estos estudios se propone que NSP2 podría funcionar como un motor molecular que facilita el empaquetamiento del genoma utilizando la energía derivada de la hidrólisis de nucleótidos trifosfato (NTPs) [39]. A los lados del octámero de NSP2 existen 4 surcos con residuos cargados positivamente que son sitios de unión de RNA. NSP2 interacciona con NSP5 y el sitio de unión de NSP5 se sobrelapa con el de unión de RNA. Esto ha permitido sugerir la posibilidad de que la interacción entre NSP2 y NSP5 podría regular la unión del RNA durante la replicación y el empaquetamiento [41].

NSP5 es una proteína dimérica con carga negativa que sufre O-glicosilación y puede ser fosforilada. Debido a diferencias en el nivel de fosforilación que sufre NSP5 pueden identificarse diferentes isómeros *in vivo*. Su hiperfosforilación es llevada a cabo por cinasas celulares y sólo tiene lugar en presencia de NSP2 (abordado en la revisión realizada por Taraporewala *et al.* [42]).

NSP6 está codificada en un marco abierto de lectura alternativo del segmento 11, que también codifica a NSP5 [43]. Es capaz de interactuar con NSP5 y también se ha reportado su acumulación en los viroplasmos [44], pero su función aún se desconoce.

NSP4 es una glicoproteína que participa en la morfogénesis viral y también funciona como enterotoxina, lo que la hace importante para la virulencia [45]. Actúa como un receptor intracelular en la membrana del retículo endoplásmico y media el transporte de partículas de doble capa hacia el lumen del retículo endoplásmico durante la maduración del virión [46], proceso sobre el cual se ahondará más adelante. Por sí sola NSP4 es capaz de inducir diarrea en ratones [47] y su propiedad de enterotoxina está asociada a su capacidad de movilizar el Ca^{2+} intracelular [48].

CICLO REPLICATIVO DE ROTAVIRUS

Rotavirus infecta los enterocitos en los extremos de las microvellosidades del intestino delgado (Fig. 7); este tropismo tan específico sugiere que existen receptores hospedero-específicos. Los rotavirus también muestran cierto grado de tropismo *in vitro*, puesto que infectan eficientemente a células de origen epitelial renal o intestinal [49]. Los estudios sobre el ciclo de replicación de los rotavirus se han realizado en cultivos de células epiteliales de riñón de mono. Inicialmente, la unión de la partícula viral a la célula está mediada por los complejos de VP4 en la capa externa del virión. El corte proteolítico de VP4 es necesario para la infectividad del virión. Se ha propuesto que el receptor funcional es un complejo de varios componentes celulares que incluye gangliósidos, integrinas y proteínas tales como hsc70 (perteneciente a la

familia de las chaperonas Hsp70), que podrían estar asociadas con balsas lipídicas. Esta organización en microdominios lipídicos podría mediar la internalización eficiente de la partícula viral [49]. El resultado es el paso del virus a través de la membrana hacia el interior de la célula. Durante este proceso tiene lugar la remoción de la capa externa del virión, de manera que en el citoplasma se liberan las partículas de doble capa transcripcionalmente activas (abordado en una revisión por Greenberg y Estes [48]).

Las DLPs producen los mRNA virales que tienen la característica de poseer un *cap*, pero no la cola de poli(A). Las DLPs contienen todas las funciones enzimáticas requeridas para la producción de los transcritos virales a partir del genoma de dsRNA, puesto que las células eucariontes no tienen RNA polimerasas capaces de transcribir mRNA a partir de moldes de dsRNA. Las funciones enzimáticas en las DLPs incluyen transcriptasa, fosfohidrolasa de nucleótidos, así como

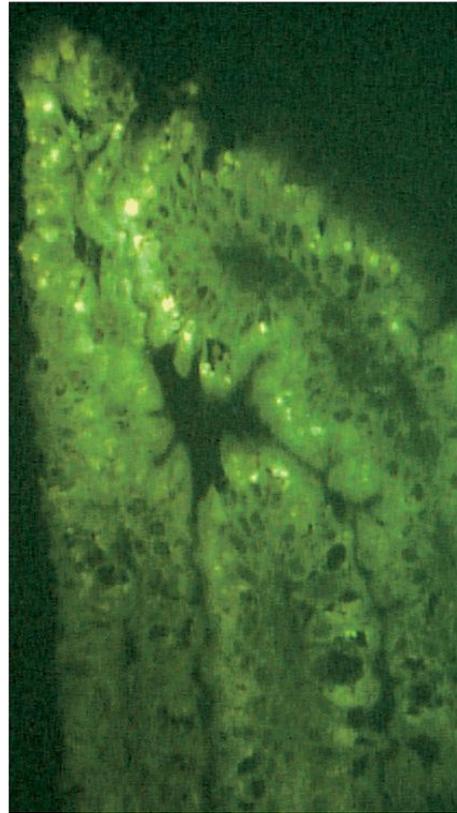


Figura 7. Rotavirus infecta los enterocitos maduros en las microvellosidades del intestino delgado. Análisis mediante inmunofluorescencia que muestra replicación de rotavirus en el íleon de una cría de rata de 5 días infectada con rotavirus. Imagen extraída de Greenberg y Estes [48].

guanililtransferasa y metilasa necesarias para adicionar el cap a los mensajeros virales. La síntesis de RNA ocurre al interior de la nucleocápside, cerca de los vértices en los ejes de simetría 5 donde se localizan los complejos transcripcionales compuestos de VP1 y VP3; los transcritos recién sintetizados salen de la partícula a través de los canales tipo I localizados en la capa intermedia del virión. Este tipo de transcripción corresponde a un mecanismo de tipo conservativo: las hebras parentales de cada segmento del genoma son retenidas en el interior de la DLP mientras que las hebras hijas son exportadas como mRNAs. Los transcritos virales también sirven como moldes para la replicación del genoma. La replicación ocurre de forma asimétrica, es decir, una hebra de RNA de polaridad positiva [RNA (+)] sirve como molde para la síntesis de una hebra de polaridad negativa [RNA (-)]. El proceso de replicación viral está restringido al citoplasma y ocurre al interior de estructuras especializadas denominadas viroplasmos que se encuentran adyacentes al núcleo, cerca del retículo endoplásmico. Los viroplasmos están compuestos de proteínas virales recién sintetizadas y también son los sitios de ensamblaje de nucleocápsides y DLPs (en revisión de Estes [4]). Recientemente, Silvestri *et al.* [50] propusieron un modelo actualizado para la transcripción y replicación del genoma. Proponen que, luego de la internalización del virión y la pérdida de la capa externa, las DLPs inician la transcripción del genoma en el citoplasma, lo que conduce a la síntesis de RNAs (+) que son incorporados a los polisomas y traducidos para producir las proteínas virales. Algunas de estas DLPs servirían también como sitios de acumulación de estas proteínas virales recién sintetizadas para iniciar la formación de los viroplasmos. Los transcritos producidos por las DLPs en los viroplasmos pueden ser capturados por una o

varias de las proteínas virales capaces de unir RNA (tales como NSP2, NSP5, VP1 y VP2) y servir como moldes para la replicación del genoma y el ensamblaje de viriones. Cuando el nivel de transcritos al interior del viroplasma excede la capacidad de unión de las proteínas de unión a RNA virales, los transcritos pueden entonces ser incorporados a los polisomas, incrementando así la expresión viral, así como la producción de proteínas requeridas para la formación de un mayor número de viroplasmatas [50].

Estudiando la cinética de transcripción y replicación del genoma de rotavirus, Ayala-Breton *et al.* [51] muestran que tanto la producción de mRNA como de dsRNA virales siguen un patrón similar en el que la cantidad de ambos se incrementa de manera lineal durante las primeras 4 horas post-infección (hpi), pero a tiempos posteriores dicho incremento se vuelve logarítmico (Fig. 8). Sus resultados les llevan a proponer que, al iniciar el ciclo replicativo, las partículas entrantes

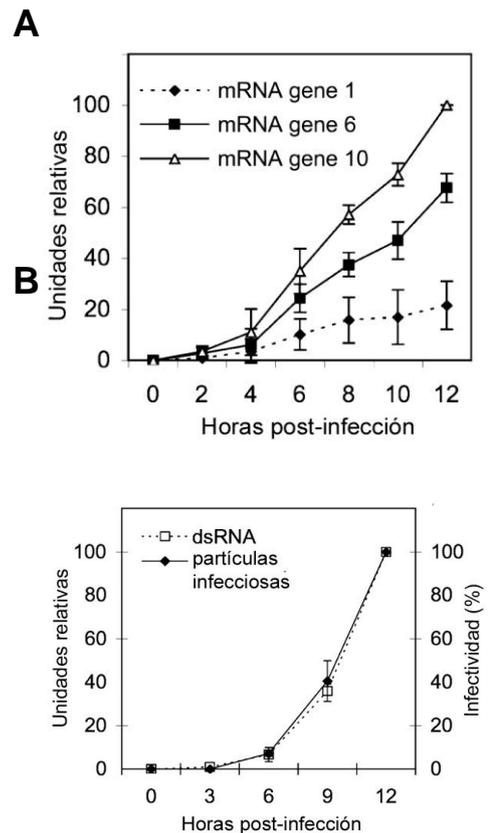


Figura 8. Cinética de la transcripción y replicación del genoma de rotavirus. A: Cinética de la producción de mRNA. **B:** Cinética de la replicación del genoma y la producción de progenie infecciosa. Imagen extraída de Ayala-Breton *et al.* [51].

comienzan produciendo una cantidad pequeña de mRNA. Dicho mRNA es traducido y replicado y esta fase del ciclo replicativo comprendería lo que se denomina como “primera ronda de transcripción” y que en la cinética de replicación viral se observa como el incremento lineal de mRNA y dsRNA durante las 4 primeras horas de infección. La expresión y replicación de dicho mRNA permite el ensamblaje de DLPs capaces de transcribir el genoma contenido en ellas, iniciando una “segunda ronda de transcripción”, que incrementa la cantidad de mRNA y dsRNA y es responsable de la fase logarítmica observada en la cinética de replicación viral (Fig. 8).

El empaquetamiento del genoma ocurre de manera simultánea a la replicación. Un modelo para el empaquetamiento y ensamblaje de DLPs fue propuesto por Lu *et al.* [52]. De acuerdo a este modelo, primero ocurriría la formación de complejos VP1-RNA (+) inactivos transcripcionalmente; a continuación, la asociación de este complejo con un decámero de VP2 constituye la unidad básica de ensamblaje de la nucleocápside; además, en este complejo va incluida también una o más copias de VP3. Posteriormente, 12 unidades básicas de ensamblaje de la nucleocápside interaccionan para dar lugar a la nucleocápside funcional. Finalmente, la proteína de la capa intermedia VP6 estabiliza la nucleocápside y media la interacción con los componentes de la capa externa [52].

Las partículas DLPs recién sintetizadas geman de los viroplasmata hacia el lumen del retículo endoplásmico en un proceso en el que las partículas virales adquieren una envoltura lipídica transitoria. Este proceso es iniciado por la unión de las DLPs a la glicoproteína transmembranal NSP4, que actúa como el receptor viral intracelular.

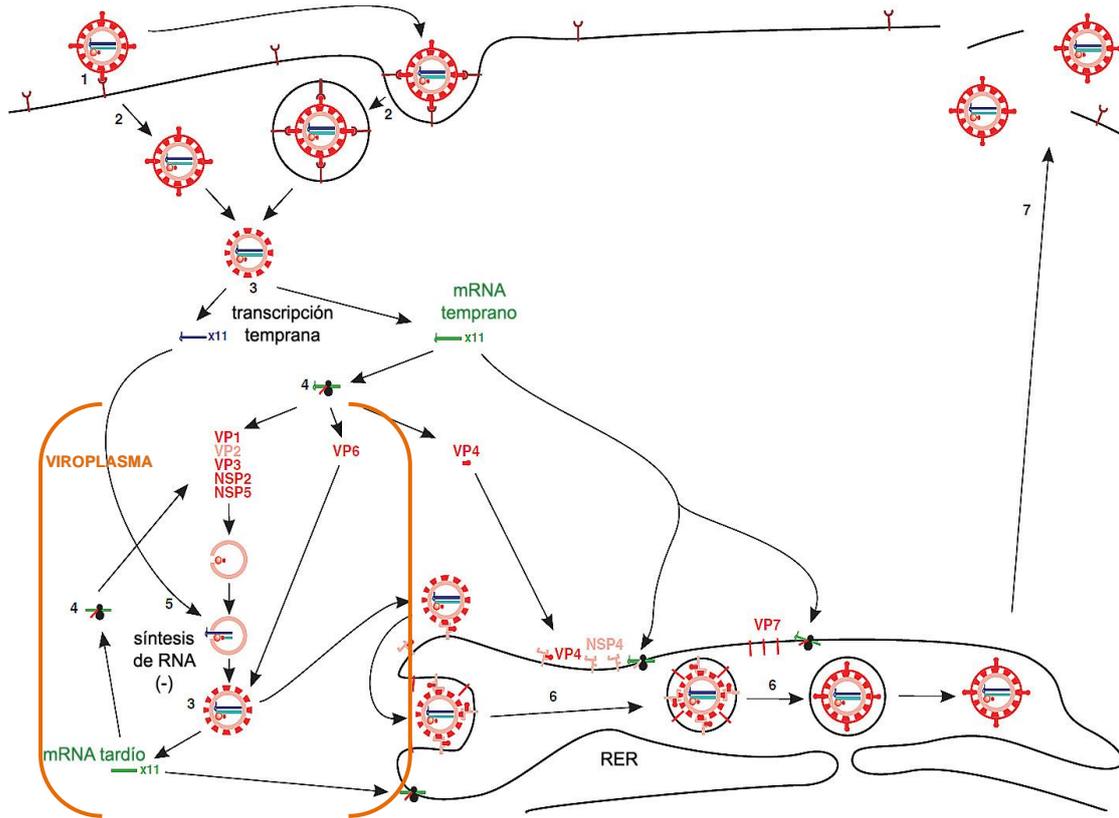


Figura 9. Representación esquemática del ciclo replicativo de rotavirus. El virión de rotavirus puede ingresar a la célula ya sea por penetración directa de la membrana plasmática o mediante endocitosis. Las DLPs liberadas en el citoplasma inician la transcripción del genoma. Una parte del RNA (+) sintetizado funciona como mRNA (verde) y comienza la síntesis de proteínas virales. NSP2 y NSP5 participan en el ensamblaje de viroplasma, donde se ensamblan los intermediarios de replicación (IRs) que contienen las proteínas VP1, VP2 y VP3. Otra parte del RNA (+) transcrito (azul oscuro) sirve como molde para la síntesis del RNA (-) (azul claro). La adición de VP6 a los IRs da lugar a DLPs. NSP4 se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE), donde interacciona con VP4 y DLPs. Este complejo ingresa al RE donde ocurren los últimos pasos del ensamblaje: la adición de VP7 para formar la capa externa del virión y la adición de los picos de VP4. Finalmente los viriones maduros son liberados de la célula ya por lisis mientras que en células polarizadas de origen entérico la gemación al retículo endoplásmico no ocurre y en cambio, hay un transporte de partículas virales a la membrana apical a través de una vía de transporte vesicular no-clásico. Imagen adaptada de *Virology: principles and applications* [53].

Los componentes de la capa externa (VP4 y VP7) se incorporan a las partículas virales durante el proceso de gemación y maduran a través de rearrreglos protéicos que ocurren al tiempo que se pierde la envoltura lipídica en el lumen del retículo endoplásmico. Finalmente, las partículas virales maduras

son liberadas de la célula por lisis celular. Alternativamente a la gemación al retículo endoplásmico, en células CaCo2 de origen entérico, ocurre un transporte de vesículas hacia la membrana apical a través de una vía de transporte no-clásica (descrito de manera muy clara en la revisión elaborada por Greenberg y Estes [48]). El ciclo replicativo de rotavirus, desde su entrada hasta su liberación, se ilustra en la Fig. 9.

ANTECEDENTES

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES GENERALES DE NSP1

NSP1 es una proteína no estructural producida por el segmento 5 del genoma de rotavirus, un peso molecular de 58 kDa y longitud variable entre cepas (oscila entre los 486-495 residuos). Una característica particular es que su secuencia se encuentra poco conservada, especialmente en lo que se refiere al extremo C- terminal. En su extremo N- terminal posee una secuencia rica en cisteínas presente en todas las secuencias del gen 5 reportadas hasta la fecha [54, 55] (Fig. 10). Interacciona con los 11 mRNAs de rotavirus y su blanco de unión se localiza cerca del extremo 5' de dichos mRNAs [28].

Ensayos de inmunofluorescencia realizados por Hua y Patton [56] en células MA-104 infectadas con la cepa de rotavirus de simio SA11 y analizadas a las 8 hpi indican que NSP1 se acumula dispersa en el citoplasma con un patrón punteado (Fig. 11). Hua *et al.* [28] también sugieren asociación entre NSP1 y el citoesqueleto. Evidencia para dicha afirmación proviene de estudios de fraccionamiento celular que muestran que NSP1 co-purifica con el citoesqueleto [28].

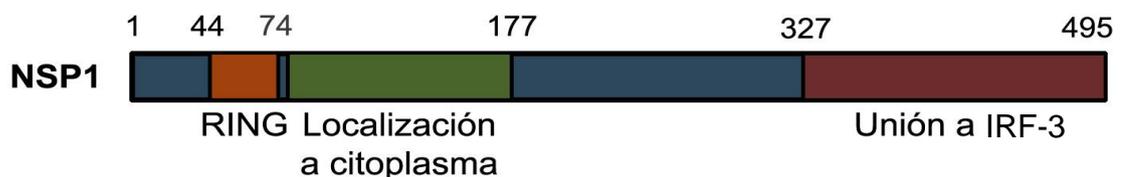


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de NSP1. Se ilustra la localización del motivo de unión a Zn tipo RING, el hipotético dominio de localización citoplásmica y el dominio de unión a IRF-3. Adaptado de Piña-Vázquez *et al.* [58].

NSP1 es la menos expresada de las proteínas virales [57, 58], representando menos del 0.1% de las proteínas totales sintetizadas a las 12 hpi [58]. Además, auto-regula su expresión mediante degradación por el proteasoma, y estudios previos realizados en el laboratorio por Piña-Vázquez *et al.* [58] muestran que proteínas virales, solas o en combinación con mRNA viral total, interfieren con dicha degradación. Se ha propuesto que el mecanismo por el que se regula la expresión de NSP1 está mediado por su posible actividad como ligasa E3 de ubiquitina, hipótesis que se abordará con detalle más adelante.

Se han identificado variantes de rotavirus que contienen rearrreglos en el segmento 5 de su genoma y por tanto son incapaces de codificar una proteína NSP1 completa, pero a pesar de ello mantienen la capacidad de crecer en cultivo celular [56]. En especial resalta la variante bovina A5-16, que codifica una NSP1 trunca que posee sólo

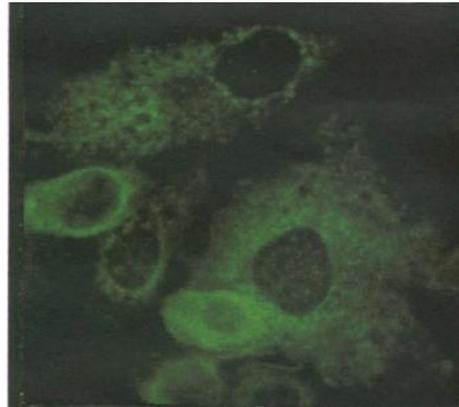


Figura 11. NSP1 se localiza dispersa en el citoplasma y con un patrón punteado. Imagen tomada de Hua *et al.* [56]

los primeros 40 residuos de la proteína silvestre, y carece del dominio de unión a Zn [59]. Estos datos sugieren que NSP1 no es esencial para la replicación viral y experimentos de silenciamiento utilizando siRNA realizados por Silvestri *et al.* [50] confirman que la proteína no es esencial para la replicación en cultivo celular. Pero claramente NSP1 tiene un papel favorable para la replicación viral, dado que las placas de lisis producidas por dichas variantes son significativamente menores que las placas producidas por sus virus parentales [59, 60]; esto sugiere que la incapacidad de producir una proteína NSP1 silvestre vuelve a las mutantes deficientes en la transmisión célula a célula [59].

NSP1 COMO ANTAGONISTA DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL CELULAR

En los últimos años se ha descubierto un papel para NSP1 como antagonista de la respuesta inmune antiviral mediada por interferón (IFN) tipo I, ilustrada en la Fig. 12. La secreción de interferón- α/β (IFN- α/β) por células que sufren infección viral es esencial para la activación autócrina y parácrina de vías que disparan la transición al estado antiviral celular. Eventos asociados a la infección viral que pueden activar la vía de señalización de IFN tipo I incluyen la internalización de la partícula viral, la producción de dsRNA y la expresión de proteínas virales. Estos eventos inducen la expresión de genes estimulados por IFN o ISGs (del inglés *IFN-stimulated gene*). Una forma de inducción de los ISGs está mediada por IRF3, cuyo monómero inactivo se acumula en el citoplasma. La infección viral estimula la fosforilación de IRF3 lo que induce cambios estructurales en IRF3 que resultan en su dimerización, la cual es la forma activa de IRF3 y posterior translocación al núcleo, donde interacciona

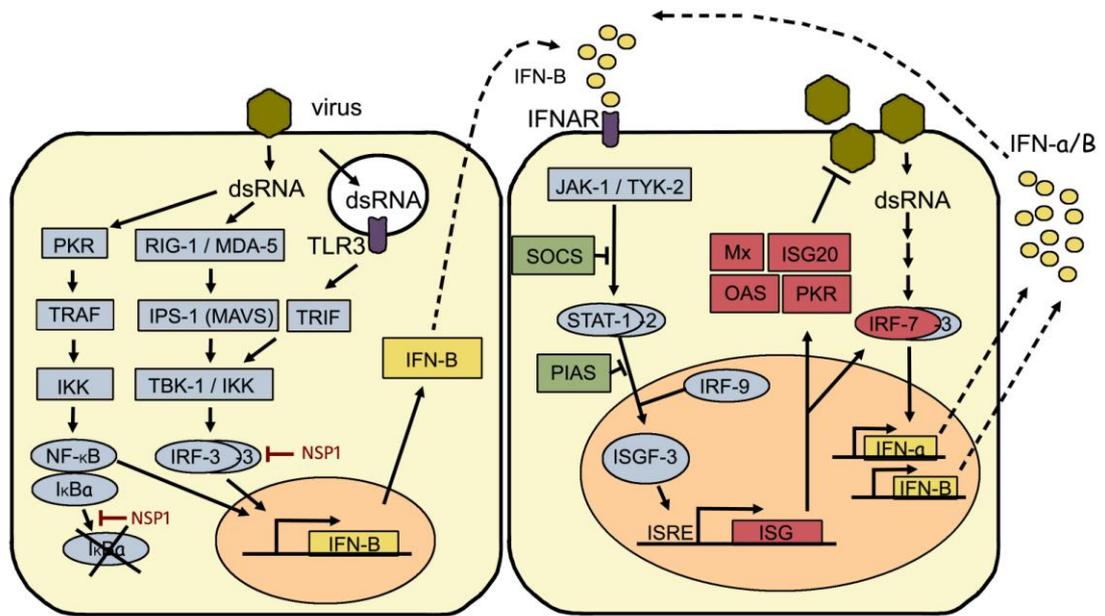


Figura 12. Representación esquemática de la vía del IFN. La presencia de dsRNA en la célula conduce a la activación de los factores de transcripción NF-κB, IRF3 y AP-1 (no se muestra). Se requiere de la acción cooperativa de estos factores para la activación del promotor del IFN-β. El complejo sensor del RNA RIG-1 y el complejo IPS-1/MAVS activan a las cinasas IKK-ε y TBK-1, estas cinasas fosforilan a IRF-3. Existe una segunda vía de activación que involucra a TLR-3 presente en endosomas y a TRIF. El IFN-β sintetizado en respuesta a la presencia de dsRNA se une al receptor de IFN tipo I (IFNAR) y activa la expresión de numerosos ISGs (*IFN Stimulated Genes*) a través de la vía de las JAK/STAT. IRF-7 amplifica la respuesta de IFN al inducir la expresión de varios subtipos de IFN-β. SOCS y PIAS son reguladores negativos de la vía de las JAK/STAT. Mx, ISG20, OAS y PKR son ejemplos de proteínas con actividad antiviral. En rojo se indican los pasos de la vía sobre los que NSP1 induce su acción inhibitoria. Imagen adaptada de Haller *et al.* [61].

con promotores específicos, estimulando así la expresión de las citocinas IFN-α e IFN-β [61].

Mediante un ensayo de dos híbridos se identificó una interacción entre NSP1 y la proteína IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) [62], un factor de transcripción celular constitutivo localizado en el citoplasma. La interacción entre NSP1 e IRF3 induce la degradación de este último de forma dependiente del proteasoma [30]. El extremo C- terminal de NSP1 se requiere para la interacción con IRF3 [62] lo cual es congruente con que variantes de NSP1

truncas en su extremo C-terminal sean incapaces de inducir la degradación de IRF3 [30].

Cepas de rotavirus que codifican una proteína NSP1 defectuosa crecen a bajos títulos en algunas líneas celulares y este fenotipo de crecimiento pobre se debe a su incapacidad de suprimir la expresión de IFN. NSP1 silvestre es capaz de apagar la vía de señalización del IFN al inducir la degradación no sólo de IRF3, sino también de IRF5 e IRF7 [63].

Otro mecanismo por el cual NSP1 contrarresta la respuesta de IFN celular es mediante la inhibición de la activación de NFκB. La inducción de la transcripción de IFNβ ocurre mediante el ensamblaje, sobre un elemento mejorador de la transcripción (*enhancer*), de un complejo proteico constituido por los factores de transcripción IRF3, NFκB y ATF2/c-Jun. Este dominio *enhancer* incrementa la expresión del promotor de IFN, así como la expresión de genes que contengan al elemento ISRE (*IFN stimulated response element*) en sus promotores. NFκB es requerido entonces para inducir la transcripción del IFNβ. El factor transcripcional NFκB se encuentra en su forma inactiva en el citoplasma, retenido ahí por asociación a la proteína inhibidora de κB (IκB). La fosforilación de IκB por cinasas tipo IKK resulta en su rápida ubiquitinación por el complejo Skp1/Cul1/F-box ($SCF^{\beta-TrcP}$), lo que conduce a su degradación por la vía del proteasoma. La degradación de IκB libera a NFκB de manera que éste puede translocarse a núcleo y activar la transcripción de sus genes blanco. Se ha reportado que algunas cepas de rotavirus son capaces de evitar la acumulación nuclear de NF-κB, así como la expresión de genes inducidos por NF-κB en respuesta a TNF-α y a la infección por rotavirus [64]. Así mismo, la proteína NSP1 de algunas cepas de rotavirus es capaz de inactivar la

respuesta de IFN al inhibir la degradación de I κ B. Esto ocurre indirectamente cuando NSP1 induce la degradación dependiente del proteasoma de β -TrCP, componente del complejo encargado de la degradación del inhibidor I κ B durante la vía de activación de NF- κ B [31]. Los pasos de la vía del IFN sobre los que NSP1 ejerce su función antagonista se indican en la Fig. 12.

Otro mecanismo por el que rotavirus parece antagonizar la respuesta de interferón es mediante la inhibición de la translocación al núcleo de los factores transcripcionales STAT1 y STAT2 [65].

Estos descubrimientos sugieren que rotavirus puede emplear múltiples estrategias para inhibir la producción de citocinas y la señalización mediada por éstas y así aminorar la respuesta inmune. La estrategia utilizada está determinada por factores dependientes de la cepa viral y la línea celular de la que se trate. En la Tabla 1 se resumen las diferencias entre distintas cepas de rotavirus respecto a la degradación de IRF-3, inducción de IFN, expresión de ISGs, activación y translocación a núcleo de NF- κ B y translocación a núcleo de STAT1/2.

La replicación de los rotavirus está restringida en hospederos heterólogos, es decir, la replicación es pobre y en dichos sistemas son incapaces de inducir diarrea a bajas dosis de virus [64, 70]. Este fenómeno se denomina restricción dependiente de hospedero. Las secuencias de NSP1 tienden a estar agrupadas filogenéticamente junto a las de sus especies hospederas cognado, lo que sugiere restricciones hospedero-específicas para la función de NSP1 [29]. Broome *et al.* [64] obtuvieron evidencia que relaciona a NSP1 con la restricción de hospedero, definida como la capacidad de una cepa de transmitirse eficientemente entre una camada de crías lactantes de ratón. Se

CEPA	ORIGEN	DEGRADACIÓN DE IRF-3	DEGRADACIÓN DE IRF-5	DEGRADACIÓN DE IRF-7	DEGRADACIÓN DE B-TrCP	REFERENCIAS
Wa	HUMANO	-	+/-	+	-	[66]
KU		-	+/-	+	-	[66]
DS-1		-	+	+	-	[66]
W61		+	+		+	[66]
AU-1		-	-	-	-	[66]
RRV	MONO	+	+	+	-	[66],[68]
SA11	SIMIO	+	+	+	-	[30],[63],[66],[67]
NCDV	BOVINO	+	-	+	-	[31],[66],[67]
UK		+	-	+	-	[66],[68]
A5-13		+				[69]
A5-16		-				[31],[66],[69]
OSU	PORCINO	-	-	-	+	[31],[66],[67]
GOTTFRIED		+	+	+	-	[66]
ETD			+	+	-	[66],[68]
K9	CANINO	+	-	-	-	[66]
30-96	LAPINO	+	+	+	-	[66]

Tabla 1. Diferencias entre cepas en la inhibición de IFN tipo I mediada por NSP1. Los signos (+), (-) y (+/-) indican degradación mediada por NSP1 del factor indicado en cada columna; el signo (-) indica que no ocurre degradación y el signo (+/-) indica un fenotipo medio de degradación. Las celdas sin ningún símbolo indican que no existen reportes sobre el efecto de NSP1 sobre dichos factores.

ha demostrado que la replicación de cepas heterólogas de rotavirus está restringida en MEFs (fibroblastos embrionales de ratón) y que esta restricción puede ser disminuida eliminando la respuesta de IFN [71]. Mediante análisis de cepas rearreglantes se encontró que este fenotipo de replicación resistente a IFN correlaciona con el segmento 5 del genoma [71]. Además, hay evidencia de que la replicación eficiente de una cepa de rotavirus en un hospedero determinado está relacionada con la degradación de IRF3 mediada por NSP1. Sen *et al.* [68] demostraron que la degradación de IRF3 durante la infección viral ocurre de manera hospedero-específica y que IRF3 es el factor mínimo involucrado en la determinación de dicha especificidad. Debido a toda la

evidencia anteriormente descrita, parecería que, luego de la infección del hospedero, la restricción en la replicación de cepas heterólogas está ligada, al menos en parte, a la respuesta temprana de IFN del hospedero, lo cual fue posible dado que IRF3 no fue degradada eficientemente por la proteína NSP1 de dichas cepas [68].

POSIBLE FUNCIÓN DE NSP1 COMO LIGASA E3 DE UBIQUITINA

La modificación de proteínas mediante la adición covalente del péptido ubiquitina (Ub) frecuentemente constituye una marca que dirige a la proteína modificada a degradación por el proteasoma. El proceso de ubiquitinación requiere una enzima activadora E1, una enzima conjugadora E2 y una ligasa E3 que confiere especificidad por el sustrato (Fig. 13). Existen dos clases de ligasas E3, las que contienen el dominio HECT y las que contienen el dominio RING. Un dominio RING típico consiste en residuos de cisteína e histidina espaciados con un patrón C3HC4 coordinando dos

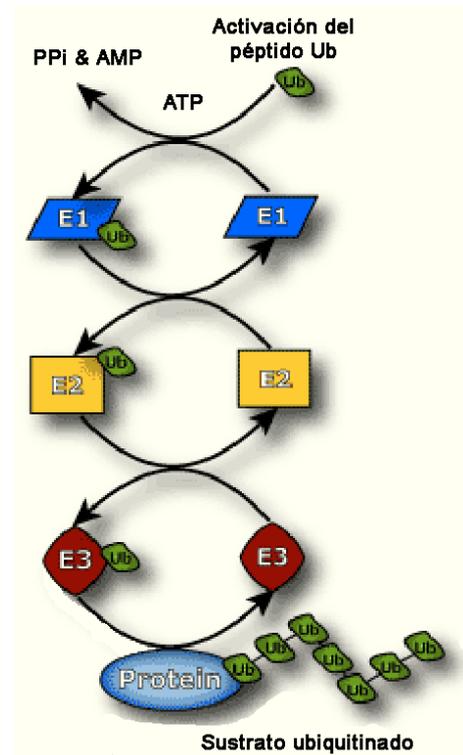


Figura 13. Esquema del proceso de ubiquitinación. La ubiquitina (Ub) es activada mediante su unión a través de un enlace tioéster a la proteína E1, proceso que requiere de ATP. La Ub activada es transferida a la enzima E2, que existe como complejo con la enzima E3. La adición de una cadena de multiUb marca a la proteína blanco para su degradación vía el proteosoma. Imagen adaptada de Boston Biochem™ Inc.

átomos de Zn [72]. NSP1 posee en su extremo N-terminal un dominio rico en cisteínas que corresponde a una variante del dominio RING de las ligasas de ubiquitina E3 (Fig. 14). Una hipótesis que explica la susceptibilidad de NSP1 a ser degradada por el proteasoma y su capacidad de inducir la degradación de IRF3, también por la vía del proteasoma, es que NSP1 podría funcionar como una ligasa de ubiquitina E3 [58]. El dominio RING es importante para la actividad de las ligasas E3. Existe una fuerte presión selectiva para conservar el dominio de unión a Zn de NSP1, puesto que los residuos de cisteína e histidina que lo conforman están completamente conservados en todas las secuencias de NSP1 reportadas hasta la fecha [54, 55]. La integridad del dominio de unión a Zn también es importante para la degradación de IRF3 [67]. La presencia del motivo RING en NSP1 constituye un elemento que podría mediar la auto-ubiquitinación de la proteína, puesto que las ligasas E3

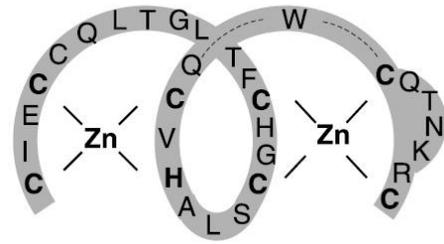


Figura 14. Dominio tipo RING putativo de NSP1. Los aminoácidos que unen Zn se muestran en negritas. Imagen extraída de Piña-Vázquez *et al.* [58].

comúnmente son capaces de auto-regularse al dirigir su propia ubiquitinación. Las variaciones reportadas en los niveles de expresión de NSP1 en células infectadas con distintas cepas de rotavirus podrían ser reflejo de los efectos acumulativos debidos a interacción diferencial con sustratos específicos o proteínas virales, así como de la auto-regulación de NSP1 en cada línea celular.

RELACIÓN ENTRE NSP1 Y LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA INDUCIDA POR LA INFECCIÓN CON ROTAVIRUS

El término apoptosis se refiere al proceso de auto-destrucción programada de células dañadas. La muerte celular por apoptosis forma parte del desarrollo normal del organismo y es importante para el mantenimiento de la homeostasis [73], aunque también está implicada en situaciones patológicas asociadas con infecciones virales y enfermedades [74, 75]. La apoptosis se caracteriza por condensación de la cromatina, encogimiento celular, alteraciones en la membrana y fragmentación del DNA [76]. Muchos virus promueven o inhiben la apoptosis celular con el fin de maximizar su patogenicidad [77]. Se ha postulado que la apoptosis representa un mecanismo antiviral que limita la replicación viral al eliminar las células infectadas. La inducción de apoptosis también podría representar un mecanismo por el cual los virus inducen la muerte celular al tiempo que limitan la inflamación y otros procesos inmunes [71]. En infecciones por rotavirus con diarrea severa y deshidratación se ha relacionado al daño citopático en enterocitos a la atrofia de las microvellosidades del intestino [78-80], aunque también se han sugerido otros mecanismos que involucran a partículas virales no-replicativas y a efectos

tóxicos producidos por NSP4 [45, 81-83]. Se ha descrito que células del yeyuno de ratón sufren apoptosis luego de infección con rotavirus murino [84]. También se ha reportado la presencia de características apoptóticas en células de intestino epitelial de humano HT-29 infectadas con el rotavirus de simio SA11 [85]. Así mismo se ha demostrado que la infección con RRV induce apoptosis tanto en células polarizadas y diferenciadas de epitelio intestinal humano Caco-2 como en células de epitelio de riñón de mono MA-104, y que este fenómeno es dependiente de la replicación viral [86, 87]. Se ha sugerido que la apoptosis inducida por rotavirus podría ser favorable para el ciclo viral al favorecer la transmisión de partículas de la progenie en los enterocitos y limitando la respuesta inflamatoria en el hospedero, puesto que la apoptosis es un proceso que no induce inflamación. El reemplazo de enterocitos maduros infectados con rotavirus por células menos diferenciadas podría resultar en una función absorptiva deficiente del epitelio intestinal y una mayor permeabilidad, lo que podría representar una contribución relevante a la diarrea asociada con la infección por rotavirus [84]. Recientemente se ha publicado evidencia que sugiere que rotavirus también puede inhibir la apoptosis celular durante las fases tempranas de la infección. El trabajo realizado por Bagchi *et al.* [69] relaciona a NSP1 con la inhibición de apoptosis prematura mediante la activación de vías de sobrevivencia relacionadas con PI3K/Akt y NF- κ B como mecanismo para favorecer el crecimiento viral durante la infección con rotavirus. La vía de PI3K/Akt (Fig. 15) está involucrada en la regulación de diversos procesos celulares tales como el metabolismo, la proliferación y la sobrevivencia y también se la ha relacionado como regulador de la endocitosis y el tráfico vesicular. La activación de PI3K (del inglés *phosphoinositide 3-*

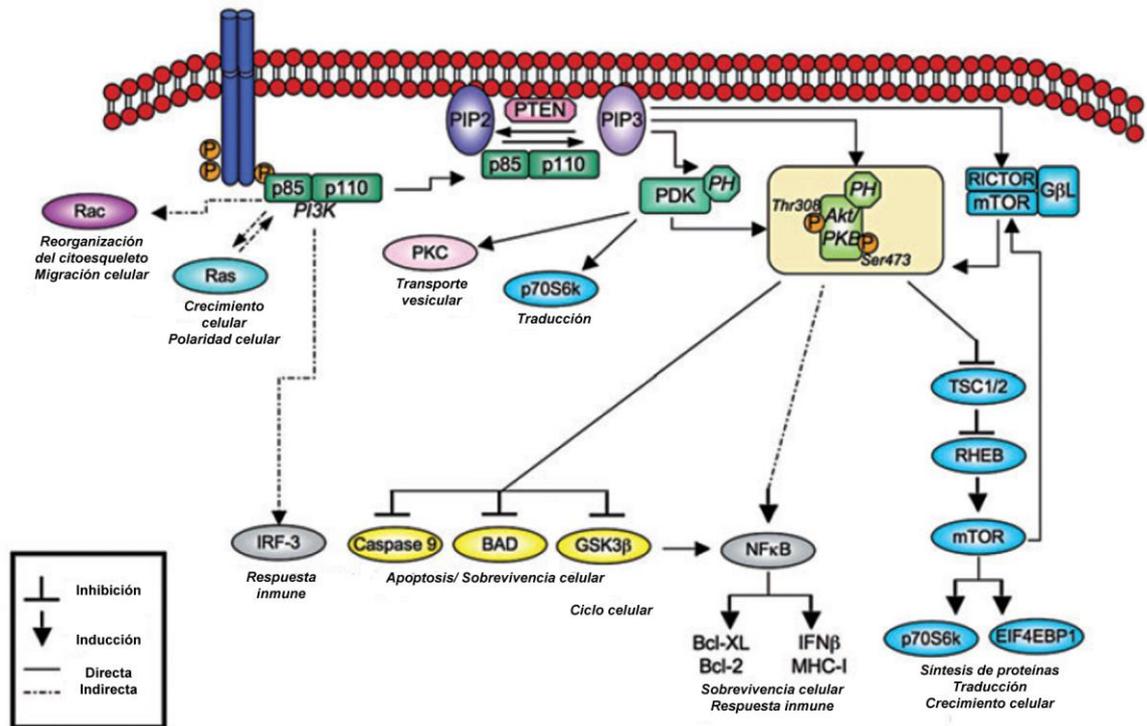


Figura 15. Representación esquemática de la vía de señalización de PI3K. La unión de ligando al receptor tirosina-cinasa conduce al reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática, donde fosforila a su sustrato lipídico fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para dar lugar a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 actúa como segundo mensajero y recluta proteínas que contienen dominio PH tales como Akt y PDK, donde son activadas. Una vez activada, la proteína Akt fosforila múltiples proteínas blanco, incluyendo a caspasa-9, BAD y GSK-3 β . También activa al factor de transcripción NF- κ B. Estos eventos conducen a la supresión de apoptosis, y también tiene efectos sobre la regulación de procesos como el metabolismo celular, la proliferación, endocitosis y tráfico vesicular. Imagen extraída de Ehrhardt y Ludwig [89].

kinase) en respuesta a citocinas, factores de crecimiento y hormonas resulta en la generación de fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato, el cual actúa como segundo mensajero y media la activación de la cinasa PDK-1 (del inglés *phosphoinositide-dependent kinase 1*). El efector principal de la vía de PI3K es la cinasa Akt, la cual es activada por PDK-1 y el complejo mTORC2. Akt actúa sobre proteínas apoptóticas, incluyendo a BAD, caspasa-9 y GSK-3 (del inglés *glycogen synthase kinase-3*) inactivándolas y así inhibiendo la apoptosis. También inhibe a factores transcripcionales de la familia FH (del inglés

Forkhead) que participan en la regulación de la transcripción de genes cruciales para la apoptosis y la proliferación celular. Akt también media la sobrevivencia celular a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que conduce a la síntesis de proteínas antivirales tales como IRF-1 y MHC clase 1, o proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 tales como Bcl-2 y Bcl-XL [88, 89].

Bagchi *et al.* [69] reportan que la infección con rotavirus induce la activación de la vía PI3K/Akt y que este evento es mediado por interacción directa entre NSP1 y PI3K; además, la activación de esta vía es independiente de la respuesta de interferón. También proporcionan evidencia de que NSP1 podría estar involucrada en la activación y translocación al núcleo de NF- κ B y de que existe correlación entre la vía de PI3K y la señalización mediada por NF- κ B durante la infección con rotavirus. Así mismo obtienen evidencia de que se requiere de la actividad de la vía de PI3K/Akt y de NF- κ B para una replicación viral eficiente y de que la activación de la vía PI3K/Akt por NSP1 resulta en una mayor expresión de proteínas anti-apoptóticas, así como en una reducción en el porcentaje de células que sufren apoptosis [69]. La inhibición de la activación de la respuesta de IFN, resultante de la degradación de IRF3, IRF5 e IRF7 y la estabilización de I κ B a través de la inducción de la degradación vía el proteasoma de β -TrCP, ambas mediadas por NSP1, con la consecuente inhibición de la respuesta antiviral, es uno de los mecanismos descubiertos por los que NSP1 estaría llevando a cabo su función promotora de la replicación viral. El segundo mecanismo fue descrito recientemente e involucra a NSP1 en la activación de la vía PI3K/Akt, mediando así la inhibición de apoptosis en células infectadas con rotavirus y promoviendo la producción de progenie viral.

La existencia de ambos mecanismos podría funcionar de manera simultánea, independiente y/o cooperativa, de manera que se estableciera un balance entre los distintos efectos de cada vía para finalmente promover la infección viral [69] (Fig. 16).

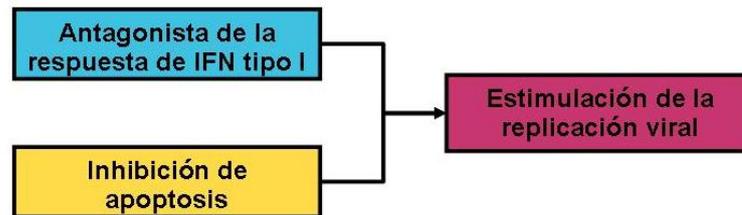


Figura 16. Modelo de los mecanismos por los que NSP1 ejerce su función pro-viral. La estimulación de la replicación de rotavirus puede resultar ya sea de la función antagonista de la respuesta de IFN de NSP1 como de la supresión de apoptosis prematura por los efectos de NSP1 sobre la vía PI3K/Akt/NF- κ B. Ambas vías podrían estar funcionando de manera independiente entre ellas o también existe la posibilidad de que ocurra señalización cruzada entre ambas.

JUSTIFICACIÓN

Rotavirus es el agente etiológico responsable de aproximadamente 527 000 muertes anuales en el mundo y es la causa de más de 2 millones de hospitalizaciones por deshidratación severa al año, afectando principalmente a niños menores de 5 años. Los mecanismos por los que el virus infecta y contienda con las respuestas antivirales de su hospedero son aspectos relevantes de estudio del ciclo infeccioso viral.

NSP1 ha sido identificada recientemente como la proteína responsable de antagonizar la respuesta antiviral celular al inhibir la expresión de IFN y otros genes relacionados. Además, se ha hipotetizado que podría llevar a cabo su función actuando como ligasa E3 de ubiquitina.

Estudios realizados con la proteína NSP1 recombinante muestran que es degradada de manera dependiente del proteasoma y que proteínas virales, solas o en combinación con mRNA total de rotavirus, interfieren con dicha degradación.

Con este trabajo pretendemos caracterizar la distribución intracelular de NSP1 en células infectadas con rotavirus y en células infectadas que expresen NSP1 recombinante mediante el sistema de expresión de vaccinia. El estudio de la distribución intracelular de la proteína NSP1 de rotavirus podría brindar información útil para investigar aspectos sobre relacionados con la función de NSP1 así como para investigar si existen factores virales que determinen la distribución y nivel de expresión de NSP1.

HIPÓTESIS

La distribución intracelular y la cinética de expresión de NSP1 están relacionadas con factores virales tales como proteínas o mRNA viral.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución intracelular de la proteína NSP1 de rotavirus.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar un protocolo de inmunofluorescencia que nos permita visualizar la expresión y localización de la proteína NSP1 de rotavirus.
2. Determinar la distribución intracelular de la proteína NSP1 de RRV (*Rhesus Rotavirus*) mediante microscopía de epifluorescencia:
 - en el contexto de la infección viral utilizando células MA-104 (de riñón de mono verde africano) infectadas con rotavirus RRV
 - fuera del contexto de la infección viral expresando a la proteína NSP1 recombinante de RRV en células BSC-1 (de riñón de mono verde africano) mediante el sistema de expresión del virus vaccinia recombinante
3. Determinar la cinética de expresión de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV
 - mediante microscopía de epifluorescencia
 - mediante Western Blot
4. Investigar qué factores determinan el nivel de expresión de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV
 - determinar si el mRNA viral afecta la distribución y expresión de NSP1

METODOLOGÍA

LÍNEAS CELULARES Y VIRUS

Para este trabajo se emplearon células MA-104 y BSC-1, ambas son de epitelio de riñón de mono verde africano. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C, 5% CO₂ en medio MEM (del inglés *Modified Eagle's Medium*) complementado con suero fetal de bovino al 7% (MEM-7).

Se trabajó con la cepa RRV de rotavirus de simio. También se utilizaron el virus vaccinia vT7lacOI (cepa parental) y el virus vaccinia recombinante vRRV5, generado por la M. en C. Carolina Piña-Vázquez [58].

Las infecciones con la cepa de rotavirus de simio RRV se realizaron en células MA-104. Para las infecciones con virus vaccinia se utilizó la línea celular BSC-1. Las infecciones se realizaron como se describe posteriormente.

DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Se retiraron las células del nitrógeno líquido donde se encontraban almacenadas y se descongelaron en agua a 37 °C; las células se vertieron lentamente en 10 mL de MEM-10 contenidos en un tubo de 15 mL y se mezclaron con suavidad; se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante; la pastilla se resuspendió en 5 mL de MEM-10; luego se adicionaron los 5 mL de células a 15 mL de MEM-10 contenidos en un frasco para cultivo de células de 75 cm² (T75) preincubado a 37 °C.; las células se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 100%.

SUBCULTIVO DE CÉLULAS

Se descartó el medio del frasco de cultivo y se lavó la monocapa de células 2 veces con 10 mL de Verseno; se agregó 1 mL de Tripsina-EDTA para frascos de cultivo T75, o 1.5 mL para frascos de cultivo T162, y se incubó durante 5 min a 37 °C, 5% CO₂; las células se desagregaron golpeando el canto del frasco, se adicionaron 9 mL de MEM-7 y se mezcló bien, repartiendo las células en frascos, cajas o laminillas multipozo, según se requiriera: a) para frascos para cultivo de células: se subcultivó el volumen deseado, y finalmente se adicionó MEM-7 hasta un volumen final de 10 mL para frascos T75, o 25 mL para frascos T162, las células se incubaron hasta confluencia; b) para placas de 96 pozos se sembraron $1 \cdot 10^4$ células en 200 µL de MEM-7 por pozo, y se incubaron durante 4 días; c) para laminillas de 16 pozos (para inmunofluorescencia) y para placas de 96 pozos (para titulación de rotavirus) se sembraron $1.2 \cdot 10^4$ células en 200 µL de MEM-7 por pozo, y se incubaron 4 días; d) para placas de 12 pozos se sembraron $2.4 \cdot 10^5$ células en 1 mL de MEM-7 por pozo, y se incubaron durante 24 hrs; e) para placas de 6 pozos se sembraron $6 \cdot 10^5$ células en 2 mL de MEM-7 por pozo, y se incubaron durante 24 hrs.

CONGELACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Se descartó el medio del frasco para cultivo de células y se lavó la monocapa 2 veces con 10 mL de Verseno; se agregaron 1.5 mL de Tripsina-EDTA (para un T162) y se incubaron las células durante 5 min a 37 °C, 5% CO₂; se desagregaron las células golpeando el canto del frasco y se adicionaron 9 mL de MEM-SS, las células se homogeneizaron bien y se transfirieron a un tubo de

15 mL estéril; el tubo se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm y se desechó el sobrenadante; la pastilla se resuspendió en 5 mL de Medio de Congelación y se homogeneizó mezclando con una pipeta; se realizaron alícuotas de 1 mL de células en viales criogénicos; los viales se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 hrs y posteriormente se transfirieron a un tanque con N_2 líquido.

INFECCIÓN CON ROTAVIRUS

Para realizar la activación del virus se procedió de la siguiente manera: Se diluyó la cantidad deseada de virus RRV en MEM-SS y se adicionó Tripsina (2 mg/mL) hasta una concentración final de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$; se agitó con vórtex y la solución se incubó durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, mezclando con vórtex cada 10 min.

La infección de células MA-104 con rotavirus activado se llevó a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento: se diluyó el virus en MEM-SS hasta obtener la cantidad deseada según la MOI que corresponde al experimento; se lavaron las células 2 veces con MEM-SS y se infectaron con el virus activado: se incubaron durante 1 hr a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 ; las células se lavaron 2 veces con MEM-SS para remover el inóculo viral y se dejó proseguir la infección a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 hasta el tiempo post-infección indicado para cada experimento.

TITULACIÓN DE ROTAVIRUS POR FORMACIÓN DE FOCOS INFECCIOSOS

Siembra de células MA-104 en placas de 96 pozos. Se sembraron 1.2×10^4 células MA-104) por pozo en una placa de 96 pozos tal y como se describió anteriormente. Las células se incubaron durante 4 días a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 .

Infección con rotavirus. Se activaron los virus a titular colocando 100 μL de Solución Activadora y 100 μL del virus correspondiente, trabajando por

duplicado; la mezcla se incubó a 37 °C, 5% CO₂, durante 30 min. Se realizaron diluciones de cada virus en MEM-SS, correspondientes a 2*10⁰, 2*10¹, 2*10², 2*10³, 2*10⁴, 2*10⁵, 2*10⁶, y 2*10⁷. Las células sembradas en la placa de 96 pozos se lavaron 2 veces con MEM-SS, dejando aproximadamente 150 µL/pozo en el último lavado, y se infectaron con 50 µL del virus activado correspondiente. Las células se incubaron durante 16 hrs a 37 °C, 5% CO₂.

Fijación. Se colocó la placa con células sobre hielo durante 15 min y se aspiró el medio dejando aproximadamente 75 µL/pozo. Se lavaron las células con 200 µL/pozo de PBS A 1X a 4 °C, y aspirando la solución hasta dejar aproximadamente 150 µL/pozo. La fijación se realizó mediante gradientes de metanol trabajando sobre hielo de la siguiente manera: se añadieron 150 µL de MeOH previamente enfriado a -20 °C y se aspiró el contenido de cada pozo, dejando aproximadamente 150 µL/pozo; el procedimiento se repitió 3 veces, y en el último aspirado se dejaron 75 µL de medio por pozo; finalmente se agregaron 200 µL/pozo MeOH, se selló la placa con parafilm y se almacenó a -20 °C durante 24 hrs.

Detección de focos infecciosos mediante inmunocitoquímica. Se volteó la placa de golpe para vaciar el MeOH y se dejó secar la placa boca abajo durante 15 min. Se realizaron dos lavados con PBS A 1X, dejando aproximadamente 75 µL/pozo en el último lavado. Se agregaron 75 µL/pozo de Suero RαR (que es un anticuerpo policlonal producido inmunizando conejos utilizando como antígeno partículas de rotavirus) en dilución (1:500) y se incubó la placa durante 2 hrs a 37 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS A 1X, dejando siempre 75 µL/pozo en cada lavado. Se agregaron 75 µL/pozo de Proteína A-Biotina (1:1000) y se incubó la placa durante 2 hrs a 37 °C. Se

realizaron 3 lavados con PBS A 1X igual que los anteriores, dejando 75 μL /pozo en el último lavado; se agregaron 75 μL /pozo de Avidina-Peroxidasa (1:1000) y se incubó la placa durante 1 hr a 37 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS A 1X, dejando 75 μL /pozo en el último lavado. Se añadieron 75 μL /pozo Solución Sustrato, y se incubó la placa entre 15-30 min en oscuridad, hasta obtener el desarrollo adecuado de la señal. La placa se lavó 2 veces con dH_2O , se volteó boca abajo para desechar el contenido y se dejó secar boca abajo.

Determinación del título viral. Se contaron los focos infecciosos a lo largo del diámetro del pozo utilizando el objetivo de 20X, y en base a los primeros 2 pozos donde el conteo sea factible se obtiene el título viral utilizando la fórmula $\text{UFF/mL} = (\text{UFF})(5)(20)(\text{factor de dilución})$.

TRANSFECCIÓN DE mRNA TOTAL DE ROTAVIRUS

Utilizamos mRNA total de rotavirus producido en el laboratorio por la M. en C. Piña-Vázquez como se describió anteriormente [58]. Brevemente, se purificaron partículas de doble capa (DLPs) a partir de lisados de células infectadas con rotavirus mediante ultracentrifugación diferencial y un gradiente de sacarosa; los DLPs son la forma transcripcionalmente activa de la partícula viral, por lo que se obtuvo mRNA_{RRV} transcrito *in vitro* adicionando 50 μL de DLPs a 200 μL de Buffer de Transcripción 2X (16 mM ATP, 5 mM GTP, 5 mM CTP, 5 mM UTP, 1 mM S-(5'-adenosil-L-metionina), 40 μL Bentonita 10X y 110 μL agua_{DEPC}) e incubando durante 6 hrs a 42 °C; los ácidos nucleicos se purificaron mediante extracción fenólica y se precipitaron con LiCl 4M.

Siembra de células MA-104 e infección con RRV. Se sembraron células MA-104 y se incubaron a 37 °C, 5% CO_2 hasta llegar a confluencia como se

describió previamente. Las células MA-104 confluentes se infectaron con RRV a la MOI indicada para cada experimento como se describió anteriormente.

Transfección del mRNA_{RRV}. El reactivo lipofectante Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen™) se diluyó en medio OPTIMEM®-S/A (sin suero y sin antibiótico) (Invitrogen™) en proporción 1:25. Posteriormente se mezcló en proporción 1:1 con mRNA_{RRV} diluido en OPTIMEM-S/A, a la concentración indicada para cada experimento, y la mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente (Mezcla de Transfección). Las células se lavaron las células 2 veces con OPTIMEM-S/A, y se transfectaron con 53 µL de la Mezcla de Transfección por pozo para el caso de laminillas de 16 pozos, o 100 µL de Mezcla de Transfección por pozo en el caso de placas de 12 pozos. Las células se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y a las 4 hrs post-transfección (hpt) se lavaron 2 veces con OPTIMEM-S/A. Posteriormente, a los tiempos indicados para cada experimento, las células fueron procesadas para su análisis mediante microscopía de epifluorescencia, o mediante Western-blot, como se describe más adelante.

INFECCIÓN CON VIRUS VACCINIA RECOMBINANTE

Se utilizaron el virus vaccinia vT7lacOI (cepa parental) y el virus vaccinia recombinante vRRV5, generado por la M. en C. Carolina Piña-Vázquez [58]. Para la activación del virus se procedió de la siguiente forma: se mezclaron en un tubo de polipropileno de 1.5 mL 240 µL de MEM-2.5, 250 µL Tripsina (0.25%) y 10 µL de virus vaccinia y se agitó con vórtex; la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C agitando con vórtex cada 10 min; el virus se sonicó en copa 3 veces durante 20 s a una amplitud de 80.

La infección de células BSC-1 en laminillas de 16 pozos con el virus vaccinia activado se llevó a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento: se diluyó el virus en MEM-SS hasta obtener la MOI que corresponde al experimento; se removió el medio de los pozos dejando 40 μL /pozo de medio y se adicionaron a cada pozo 50 μL MEM-2.5 y 50 μL del virus vaccinia; las células se incubaron a 37 °C, 5% CO_2 durante 1 hr y posteriormente se lavaron 2 veces con MEM-2.5 para remover el inóculo viral excedente; se retiró el medio, se agregaron 100 μL /pozo de IPTG 1000 μM y las células se incubaron a 37 °C hasta las 15 hpi.

Sobre el sistema de expresión del virus vaccinia

El virus vaccinia se utiliza extensamente como vector para la expresión de genes en células de mamífero. Este sistema difiere radicalmente de otros en que la transcripción ocurre en el citoplasma de la célula y no en el núcleo. Se han diseñado multitud de variaciones del sistema. En una de las variaciones del sistema el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 se integra en el genoma del virus vaccinia de manera que los genes controlados por promotores T7 puedan ser expresados, ya sea se encuentren en plásmidos transfectados o en un virus vaccinia recombinante [90].

- Sistema híbrido de vaccinia/T7 RNA polimerasa. Este sistema se basa en la síntesis de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. El gen de interés es insertado en el plásmido *pVOTE.1* bajo control del promotor de la RNA polimerasa T7 (p_{T7}). Este plásmido recombinante es introducido por transfección mediada por liposomas al citoplasma de células infectadas con vTF7-3 (un virus vaccinia recombinante que codifica la RNA polimerasa T7). Esto permite que el gen de interés sea transcrito con gran eficiencia por la RNA polimerasa T7. Además, el

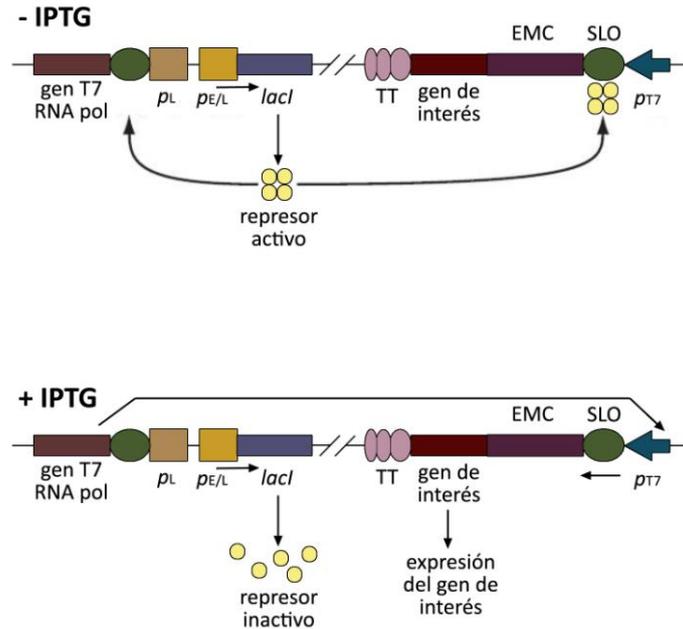


Figura 17. Representación esquemática del sistema de expresión VOTE. Se ilustran porciones del genoma del virus vaccinia que contienen elementos reguladores. La transcripción del represor *lacI* se encuentra bajo control del promotor $p_{E/L}$ de vaccinia que se transcribe continuamente, lo que resulta en la síntesis de represor que se une a su operador *lacO* adyacente al promotor de vaccinia p_L , evitando así la transcripción de la RNA polimerasa T7; el represor también une otro elemento operador *lacO* modificado (SLO) adyacente al promotor T7 (p_{T7}) inhibiendo la transcripción del gen blanco en caso de que ocurra síntesis de escape de la RNA polimerasa T7. En presencia del inductor IPTG (ver panel inferior), el represor es inactivado, la RNA polimerasa de vaccinia transcribe el gen T7 y se sintetiza la RNA polimerasa T7. La RNA polimerasa T7 se une al promotor T7 y transcribe al gen de interés hasta el terminador (TT). La traducción del mRNA del gen de interés es aumentada por la secuencia IRES del virus EMC. Imagen extraída de *Current Protocols In Molecular Biology* [91].

plásmido contiene una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) del virus EMC (encefalomiocarditis) que permite altos niveles de traducción de la proteína de interés [91].

- Sistema VOTE (vaccinia virus/lac operon/T7 RNA polimerase/ EMC IRES). Este sistema utiliza el vector de transferencia *pVOTE-1*, que permite regulación de la expresión del gen de interés porque contiene al operador *lacO* de *E. coli* regulando al gen de la RNA polimerasa T7 y otra copia del operador regulando al promotor T7 que controla la expresión del gen de interés. Si se infecta con un virus vaccinia que

codifique al represor de lactosa de *E. coli* (producto del gen *lacI*). La expresión del gen de interés se induce mediante la adición de IPTG (Fig. 17). Este sistema requiere la generación de virus vaccinia recombinantes [90]. Para generar los virus recombinantes se infectan células CV-1 (de riñón de mono) con una variante recombinante del virus vaccinia que codifica la RNA polimerasa T7 y el represor *lac* (cepa parental vT7lacOI) y se cotransfecta con el plásmido *pVOTE* conteniendo al gen de interés. En estas condiciones se seleccionan las recombinantes con ácido micofenólico (MPA), gracias a la presencia del gene de la guanosina fosforibosil transferasa en el plásmido vector, que contiene resistencia al MPA. Los virus vaccinia recombinantes permiten expresar al gen de interés controlado por el promotor de la RNA polimerasa T7 y traducido con altos niveles gracias a la presencia del IRES del virus EMC [91].

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

En la Fig. 18 se resume el proceso de la inmunofluorescencia indirecta haciendo hincapié en los pasos más relevantes de la técnica. En la Fig 30B se ilustra el mecanismo para la generación de la señal en la que se basa la técnica.

Siembra de células MA-104 o BSC-1 en laminillas de 16 pozos. Se sembraron $1.2 \cdot 10^4$ células MA-104 (para infección con rotavirus) o BSC-1 (para infección con virus vaccinia) por pozo en portaobjetos de 16 pozos tal y como se

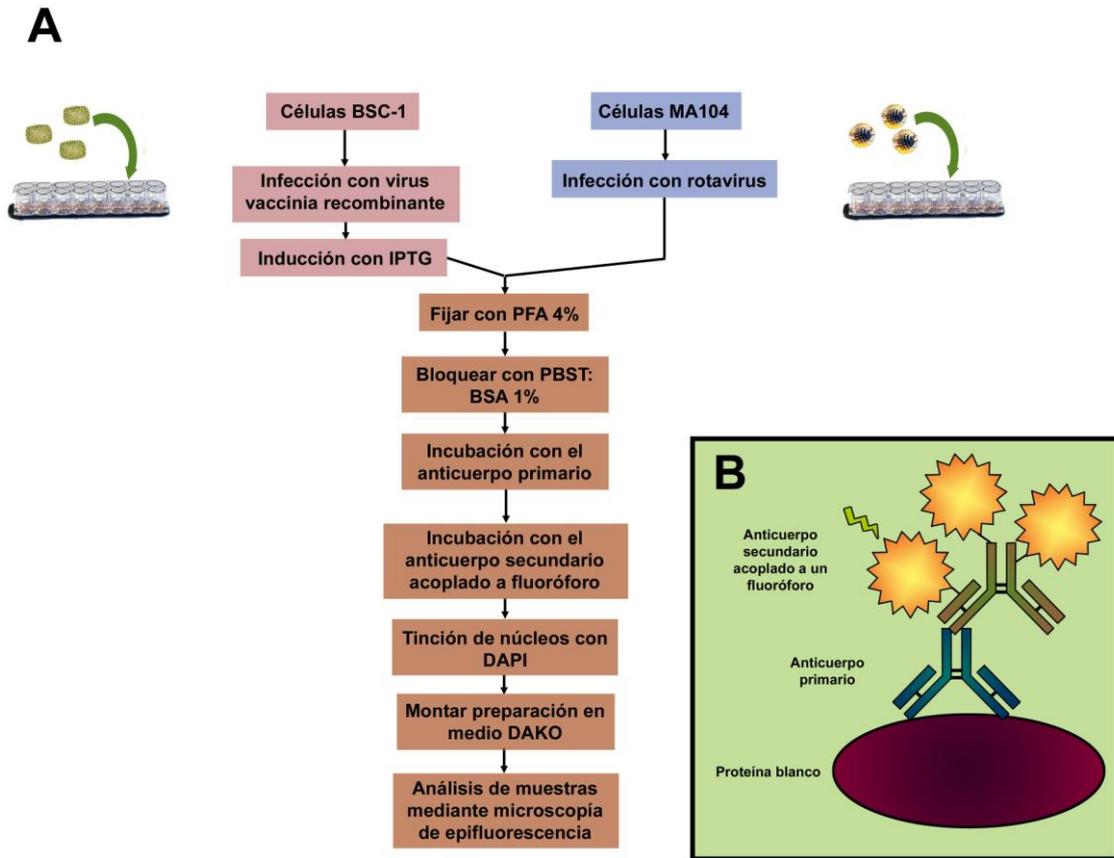


Fig. 18. Esquema general del procesamiento de células para su análisis mediante inmunofluorescencia. A: Se ilustran los pasos relevantes de la técnica para la detección de la proteína NSP1 recombinante (rosa) o de la proteína NSP1 en el contexto de la infección viral (azul). **B:** Se ilustra el fundamento de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. El anticuerpo primario se une a su proteína blanco, y esta interacción es detectada y amplificada mediante un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo. La estimulación del fluoróforo con un láser a determinada longitud de onda genera la señal fluorescente que es detectada mediante un microscopio de epifluorescencia.

describió anteriormente. Las células se incubaron durante 4 días a 37 °C, 5% CO₂.

Infección con rotavirus o con virus vaccinia. La activación del virus e infección de las células se realizó como se describió previamente. Las células infectadas se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ hasta el tiempo post-infección indicado en cada experimento.

Fijación y tinción. Para la inmunofluorescencia las células se fijaron con paraformaldehído al 4% de acuerdo al siguiente protocolo: se lavaron las

células con 200 μ L de PBS (1X) a temperatura ambiente; se retiró el PBS y se agregaron 200 μ L/ pozo de PFA 4% durante 15 min a temperatura ambiente; se lavó 3 veces por 5 min con 200 μ L de PBS A (1X) a 4 °C.

Para la tinción se empleó una estrategia de detección indirecta utilizando un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo, y se siguió el procedimiento que se describe a continuación. Las células se permeabilizaron durante 10 min con PBST (0.1%) y se bloqueó durante 1 hr con PBST:BSA (1%), el anticuerpo primario se diluyó en PBST:BSA (1%) hasta la concentración indicada en el experimento y se microcentrifugó durante 2 min a velocidad máxima, se retiró la solución de bloqueo, se agregaron 60 μ L/pozo de anticuerpo primario y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados de 10 min con PBST:BSA (1%), se diluyó el anticuerpo secundario correspondiente en PBST:BSA (1%), se microcentrifugó la dilución durante 2 min a velocidad máxima, se removió el PBST:BSA (1%) de los pozos, se agregaron 40 μ L/pozo de anticuerpo secundario y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Para dar contraste a los núcleos se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS A (1X), se retiró el PBS A (1X) de los pozos y se agregaron 50 μ L/pozo de solución de DAPI, se incubó durante 1 min protegiendo de la luz; se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS A (1X), se retiró el PBS A (1X) y se montó la laminilla en medio DAKO; se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos largo de 24*60mm y se selló con barniz de uñas. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron los siguientes: para la detección de NSP1 se empleó el anticuerpo policlonal GP294b producido en el laboratorio por la M. en C. Piña-Vázquez a partir de cuyos inmunizados con la proteína NSP1 de RRV expresada en *E. coli* y purificada mediante SDS-PAGE; para la detección de

VP6 v VP2 se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón 1E11 y 3A8, respectivamente, producidos en el laboratorio del Dr. H. Greenberg; para la detección de NSP2 se utilizó el anticuerpo monoclonal 952, producido en el laboratorio del Dr. H. Greenberg. Para la detección de lamina se utilizó el anticuerpo comercial de ratón Lamin A/C (636) sc-7292 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Visualización al microscopio. La obtención de imágenes se llevó a cabo mediante microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Olympus IX70 acoplado a una cámara CoolSNAP-Pro (Media Cybernetics®). Las imágenes fueron analizadas empleando el programa Image-Pro Plus v6.2.

WESTERN-BLOT

En la Fig. 19 se resume el proceso de Western-blot haciendo hincapié en los pasos más relevantes de la técnica y se ilustra el mecanismo para la generación de la señal en la que se basa.

Siembra de células MA-104. Se sembraron 5×10^5 células MA-104/pozo (para placas de 6 pozos) o 2×10^5 células MA-104/pozo (para placas de 12 pozos), tal y como se describió anteriormente. Las células se incubaron durante 24 hrs a 37 °C, 5% CO₂.

Infección con rotavirus. La activación del virus y la infección de las células se realizaron como se describió previamente. Las células infectadas se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ hasta el tiempo post-infección indicado para cada experimento.

Cosecha. Al tiempo post-infección indicado, la placa con células infectadas se colocó sobre hielo durante 10 min. A partir de este punto se trabajó sobre hielo.

Se aspiró el medio y se agregó 1 mL por pozo de PBS 1X frío. Se desprendieron las células del pozo con ayuda de un gendarme y se transfirió el contenido de cada pozo a tubos de polipropileno de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron durante 1 min a 14 000 rpm, a 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y los tubos con la pastilla se colocaron de inmediato en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta el momento de ser procesadas.

Preparación de los lisados celulares. Para lisar las muestras se siguió el siguiente protocolo: se colocaron las muestras almacenadas a -80° C sobre hielo seco y se descongelaron con 20 µL (para el contenido de un pozo de 2.2 cm diámetro) o con 40 µL (para el contenido de un pozo de 3.5 cm diámetro) de Buffer de Digestión, agitando con vórtex hasta resuspender cada muestra. A partir de este punto todo se trabajó sobre hielo. Las muestras se sonicaron durante 20 s, 3 veces, a una amplitud de 80 y a 4° C. Posteriormente se agitaron con vórtex moderado y se

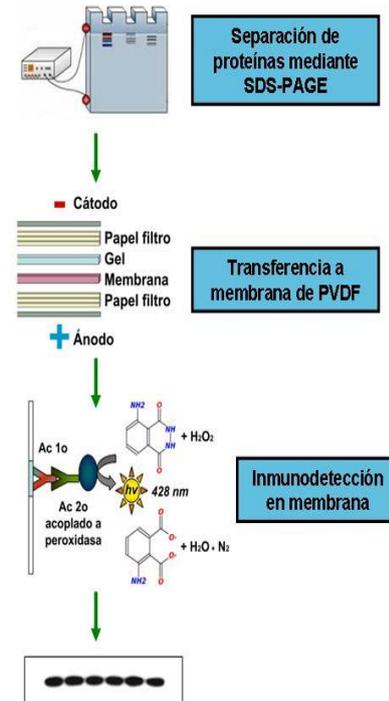


Fig. 19. Esquema general de la detección de proteínas mediante Western-blot. Las proteínas se separan mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12% y posteriormente se transfieren a una membrana de PVDF. Para la detección de la proteína de interés, la membrana se incuba con un anticuerpo primario específico para dicha proteína, y dicha interacción es amplificada mediante un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa, la cual es capaz de oxidar a su sustrato, luminol, en presencia de peróxido de hidrógeno, reacción que genera luz. Dicha actividad enzimática puede ser detectada mediante películas de autoradiografía.

incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo adicionando 2 μ L/tubo de EDTA 100 mM pH=7.2. A cada tubo se agregó el volumen correspondiente de Buffer de Muestra 2X, para una concentración final 1X, y las muestras se hirvieron durante 5 min.

Electroforesis de proteínas e inmunodetección en membrana. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para una descripción de la preparación de los geles de poliacrilamida consultar el Apéndice. Una vez realizada la separación de proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (BioRad, Cat.: 162 0177) de acuerdo al siguiente procedimiento: el gel de poliacrilamida se equilibró durante 15 min en Buffer de Transferencia; la membrana de PVDF, del tamaño del gel, se humedeció durante 5 min en metanol, y posteriormente se equilibró durante 10 min en Buffer de Transferencia; se armó el sándwich de transferencia sobre una cámara de transferencia semi-seca Hoefer TE 70 (Amersham Biosciences) tal y como especifica el fabricante, colocando 3 capas de papel filtro del tamaño del gel, previamente humedecido en Buffer de Transferencia, seguidas de la membrana de PVDF, el gel, y otras 3 capas de papel filtro, evitando queden burbujas en el sándwich; las condiciones de transferencia se establecieron para cada gel en base a las especificaciones del fabricante. La membrana se bloqueó con TBS-Tween 0.15%-leche 5% (TTBS-leche 5%) utilizando leche descremada (Svelty, Nestlé®) durante 2 hrs a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en TTBS-leche 1%, durante 1 hr (2.5 hrs en el caso del anticuerpo GP294b α NSP1 SDS-PAGE 191006) y a temperatura ambiente, con agitación.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron los siguientes: para la detección de NSP1 se empleó el anticuerpo policlonal de cuyo GP294b α NSP1 SDS-PAGE 191006 descrito anteriormente a una dilución 1:500; para la detección de NSP2 se utilizó el suero policlonal de cuyo α NSP2-cuyo-6ta inmunización producido en el laboratorio a una dilución 1:5000; para la detección de GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada) se utilizó el anticuerpo de ratón monoclonal α -GAPDH clona 6C5 (Chemicon, Millipore™, Cat: MAB374) a una dilución 1:15 000.

La membrana se lavó con TTBS-leche 1% por 3 veces, durante 10 min, a temperatura ambiente y con agitación. Se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en TTBS-leche 1% durante 1 hr a temperatura ambiente, con agitación.

Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron los siguientes: cabra anti-cuyo (Sigma-Aldrich®, Inc., Cat: A7289) a una dilución 1:10 000, y cabra anti-ratón HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat.: sc-2005) a una dilución 1:10000.

La membrana se lavó con TTBS 3 veces, 10 min por lavado y la señal fue desarrollada utilizando el kit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat.:34095) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y utilizando películas películas X-OMAT (Kodak, Cat.: 161 1342).

Remoción de anticuerpos de la membrana. Para reutilizar una membrana previamente sometida a inmunodetección de proteínas, la membrana se lavó durante 5 min en agua destilada; posteriormente se trató con Solución de Stripping durante 30 min a 50 °C, se enjuagó 2 veces con agua destilada y se

lavó durante 15 min con agua destilada; posteriormente se prosiguió con el protocolo de inmunodetección descrito anteriormente, retomando el procedimiento desde el bloqueo de la membrana con TTBS-leche 5%.

Densitometría. La intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ 1.43u.

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DE NSP1

Se estandarizó el protocolo de inmunofluorescencia indirecta para la doble tinción de NSP1 y de las proteínas NSP2 o VP6 como marcadores de infección. Para ello se probaron 12 sueros policlonales contra NSP1 disponibles en el laboratorio. Encontramos que el suero GP294b α NSP1 SDS-PAGE 191006 era el que daba una mejor proporción señal/ruido de fondo y fue el que elegimos para realizar los experimentos subsecuentes. Dicho suero fue producido en el laboratorio inmunizando cuyos utilizando como antígeno la proteína NSP1-His6 de RRV expresada en *Escherichia coli* y purificada mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida.

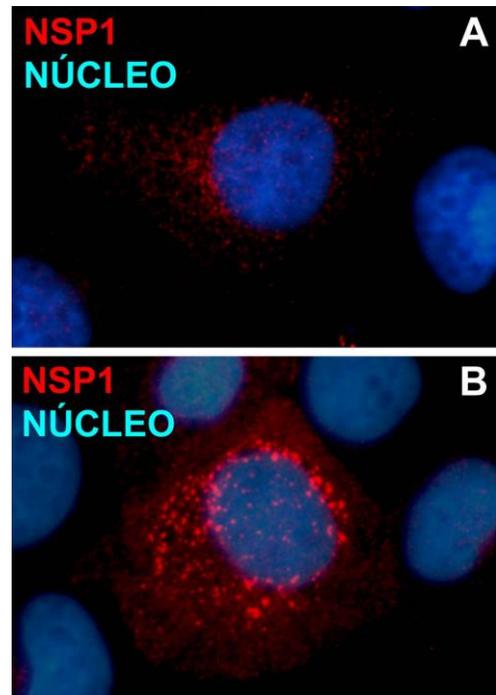


Figura 20. Distribución general de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV. Patrones de distribución punteado (A) o en cúmulos (B) de la proteína NSP1. Se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 0.1 y se fijaron a las 15 hpi. Posteriormente se procesaron las muestras para análisis mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal contra NSP1 (rojo). El núcleo se muestra en azul.

DISTRIBUCIÓN GENERAL DE LA PROTEÍNA NSP1 EN CÉLULAS MA-104 INFECTADAS CON RRV

Con la finalidad de analizar la distribución intracelular de NSP1 a lo largo del ciclo replicativo de rotavirus se infectaron células MA-104 con rotavirus de simio RRV y se realizó la detección de NSP1 a distintos tiempos post-infección mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo policlonal GP294b α NSP1 SDS-PAGE 191006 descrito anteriormente. Nuestros resultados muestran que NSP1 posee un patrón de distribución muy heterogéneo en cuanto a su localización y a la intensidad de la señal, incluso a un mismo tiempo post-infección. En general, NSP1 se distribuye de manera difusa en el citoplasma, con un patrón punteado y se localiza preferentemente cerca de la región perinuclear (Fig. 20). Se encontró que, a un mismo tiempo post-infección y en base a una clasificación subjetiva, las células infectadas pueden mostrar baja expresión de NSP1 (Fig. 20A) o alta expresión de NSP1 (Fig. 20B). También se observó que NSP1 puede localizarse en cúmulos (de mayor tamaño que la distribución punteada) que varían en tamaño e intensidad y generalmente presentan bordes irregulares (Fig. 20B).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NSP1 DE RRV EN CÉLULAS MA-104 MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Para determinar el nivel de expresión de NSP1 en el contexto de la infección viral se infectaron células MA-104 con RRV a distintos tiempos post-infección y se determinó el nivel de expresión de NSP1 mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 21A). La intensidad de la expresión de NSP1 puede variar desde muy baja, siendo idéntica o apenas distinguible de la intensidad

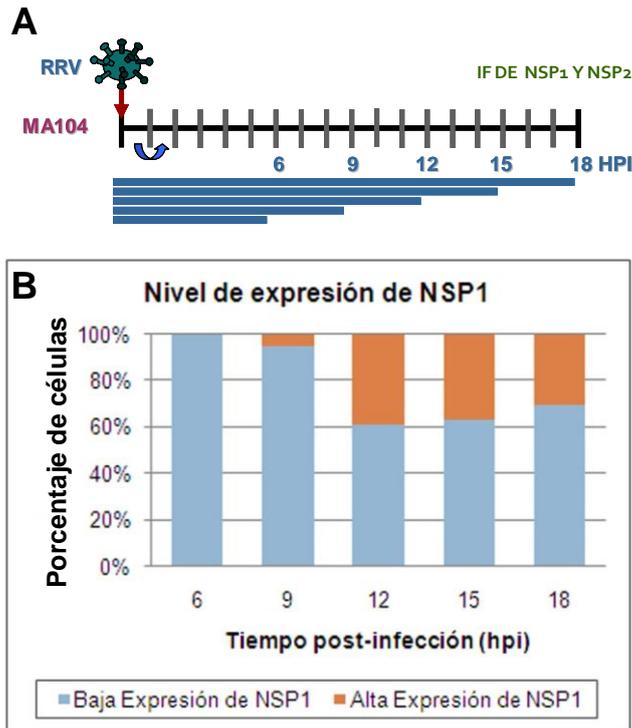


Figura 21. Cinética de expresión de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV. **A:** Esquema del experimento, realizado con células MA-104 infectadas con RRV a una MOI de 0.1 durante 1 hr, y analizadas mediante microscopía de epifluorescencia a las 6, 9, 12, 15 y 18 hpi. Se incubaron con anticuerpos contra NSP1 y NSP2 (como marcador de infección). Las células positivas para NSP2 se clasificaron de acuerdo al nivel de expresión de NSP1 (alto o bajo) **B:** El 60% o más de las células infectadas expresa un bajo nivel de NSP1 a todos los tiempos post-infección estudiados.

del ruido de fondo, a alta expresión de NSP1 (Fig. 20). A todos los tiempos post-infección estudiados, aproximadamente el 60% o más de las células muestran una baja expresión de NSP1 (Fig. 21B). A partir de las 12 hpi se incrementa el porcentaje de células con alta expresión de NSP1, llegando a representar el 30-40% del total de células infectadas (Fig. 21B).

CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN DE NSP1 EN CÉLULAS MA-104 INFECTADAS CON RRV

Para estudiar la cinética de distribución de NSP1 a lo largo de la infección por RRV se infectaron células MA-104 con RRV y a distintos tiempos post-infección se analizó la distribución intracelular de la proteína mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 22A). La cinética de distribución de NSP1 entre las 6 y las 18 hpi puede describirse de la siguiente manera:

- a las 6 hpi no se detecta expresión significativa de NSP1 (Fig. 22C)

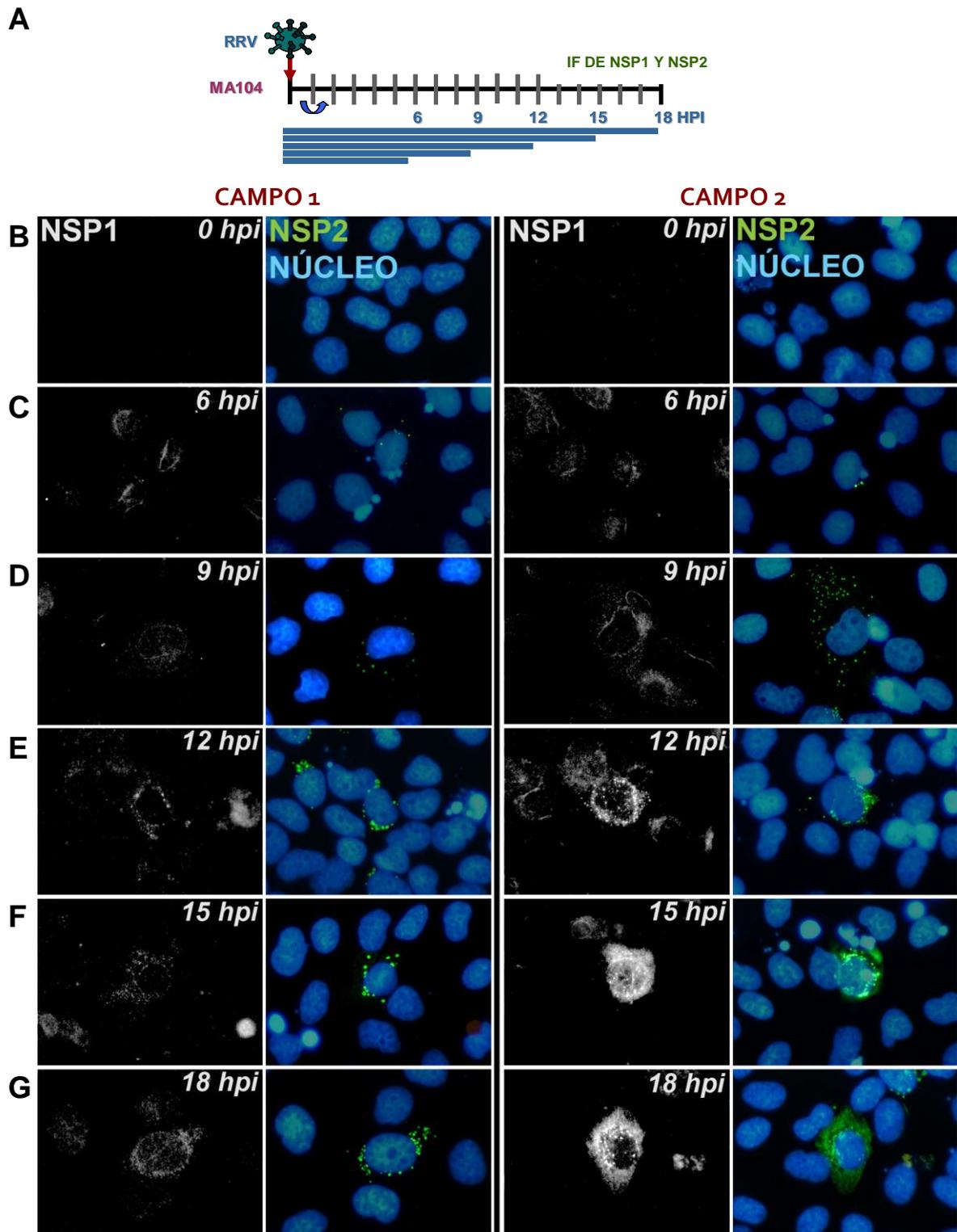


Fig. 22. Cinética de la distribución intracelular de NSP1. **A:** Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 0.1 y se fijaron las células a las 6, 9, 12, 15 y 18 hpi; posteriormente se procesaron para análisis mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos primarios contra NSP1 y contra NSP2 (no se muestra) como marcador de infección. **B:** células sin infectar; **C:** 6 hpi.; **D:** 9 hpi.; **E:** 12 hpi.; **F:** 15 hpi.; **G:** 18 hpi. Se muestran 2 campos por cada condición, para mostrar la heterogeneidad de los resultados obtenidos.

- a las 9 hpi la expresión de NSP1 sigue siendo muy baja pero comienza a ser evidente la distribución difusa y citoplásmica de NSP1 (Fig. 22D)
- a partir de las 12 hpi, tiempo en el que se incrementa la expresión de la proteína, y hasta las 18 hpi la distribución predominante de la proteína es difusa y citoplasmática, aunque es posible encontrar células en las que NSP1 se localiza en cúmulos (Fig. 22E, 22F y 22G).

CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE NSP1 EN CÉLULAS MA-104 INFECTADAS CON RRV

El modelo del ciclo replicativo de rotavirus propone que a las 12 hpi ya ha concluido la replicación del virus. Además, estudios sobre la proteína NSP1 en el ciclo replicativo viral muestran que esta proteína ejerce su función a tiempos post-infección previos a las 12 hpi [57, 92]. Puesto que la técnica de inmunofluorescencia no permite detectar con suficiente sensibilidad la expresión de NSP1 previo a las 12 hpi se requería emplear otra técnica más sensible con la cual poder estudiar a la proteína NSP1 a tiempos más tempranos durante la infección con rotavirus. Para ello se estandarizó un ensayo de Western-blot que permitiera corroborar los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia. Una vez establecidas las condiciones para la realización del Western-blot se determinó la cinética de expresión de NSP1 infectando células MA-104 con RRV (Fig. 23). Encontramos que el nivel de expresión de NSP1 es bajo a las 6 y 9 hpi y que éste se incrementa considerablemente a partir de las 12 hpi. Estos resultados son congruentes con los obtenidos mediante microscopía de epifluorescencia y sugieren que la

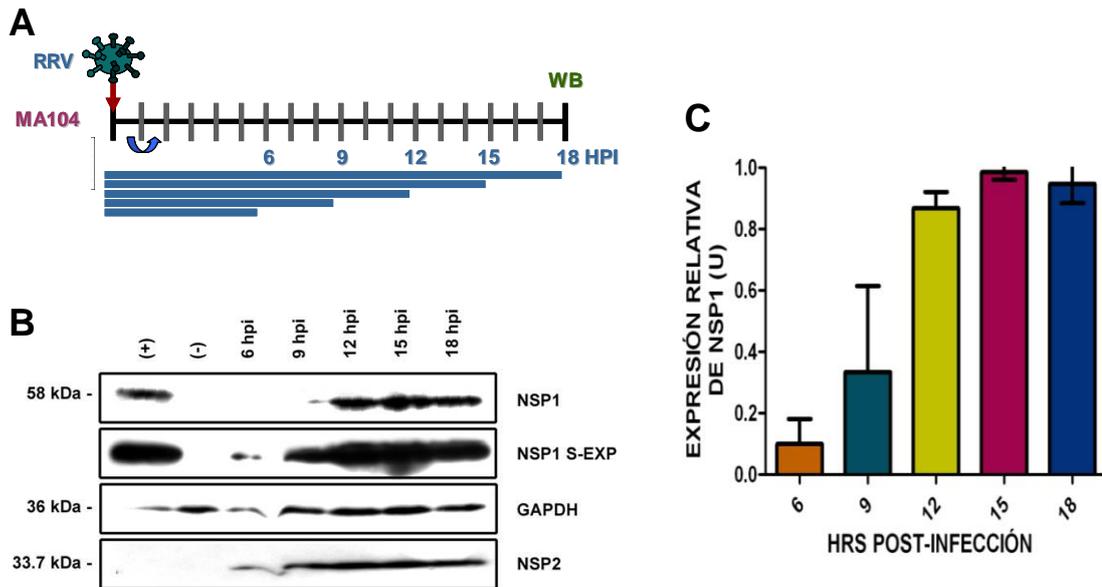


Fig. 23. Cinética de expresión de NSP1. **A:** Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 10 durante 1 hr; la infección se dejó proseguir durante 6, 9, 12, 15, o 18 hpi momento en el que se prepararon los lisados celulares para su análisis mediante Western-blot; las membranas se incubaron con anticuerpos contra NSP1, NSP2 como control de infección viral y GAPDH como control de carga. **B:** Western-blot de los lisados celulares obtenidos a partir de células infectadas a distintos tiempos post-infección; (+): control positivo de expresión de NSP1 obtenido de células que expresan rNSP1 mediante el sistema del virus vaccinia; (-): células MA-104 sin infectar; se muestran las bandas correspondientes a la expresión de NSP1, NSP2 y GAPDH; la fila correspondiente a NSP1 S-EXP corresponde a una sobreexposición de las bandas mostradas en la fila de NSP1, para mostrar que es posible detectar la expresión de la proteína a todos los tiempos post-infección estudiados. **C:** Representación gráfica de la cinética de expresión de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV; los resultados obtenidos se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH; se muestra el resultado de 3 experimentos independientes.

expresión de NSP1 se encuentra estrechamente regulada a lo largo del ciclo replicativo viral.

UN ALTO NIVEL DE EXPRESIÓN DE NSP1 CORRELACIONA CON DISTRIBUCIÓN ALTERADA DE LAS PROTEÍNAS VIRALES VP6 Y NSP2

Durante la determinación de la distribución intracelular de NSP1 observamos que las células infectadas que presentan mayor expresión de NSP1 suelen tener una distribución alterada de las proteínas VP6 y NSP2 (ver Fig. 22). De

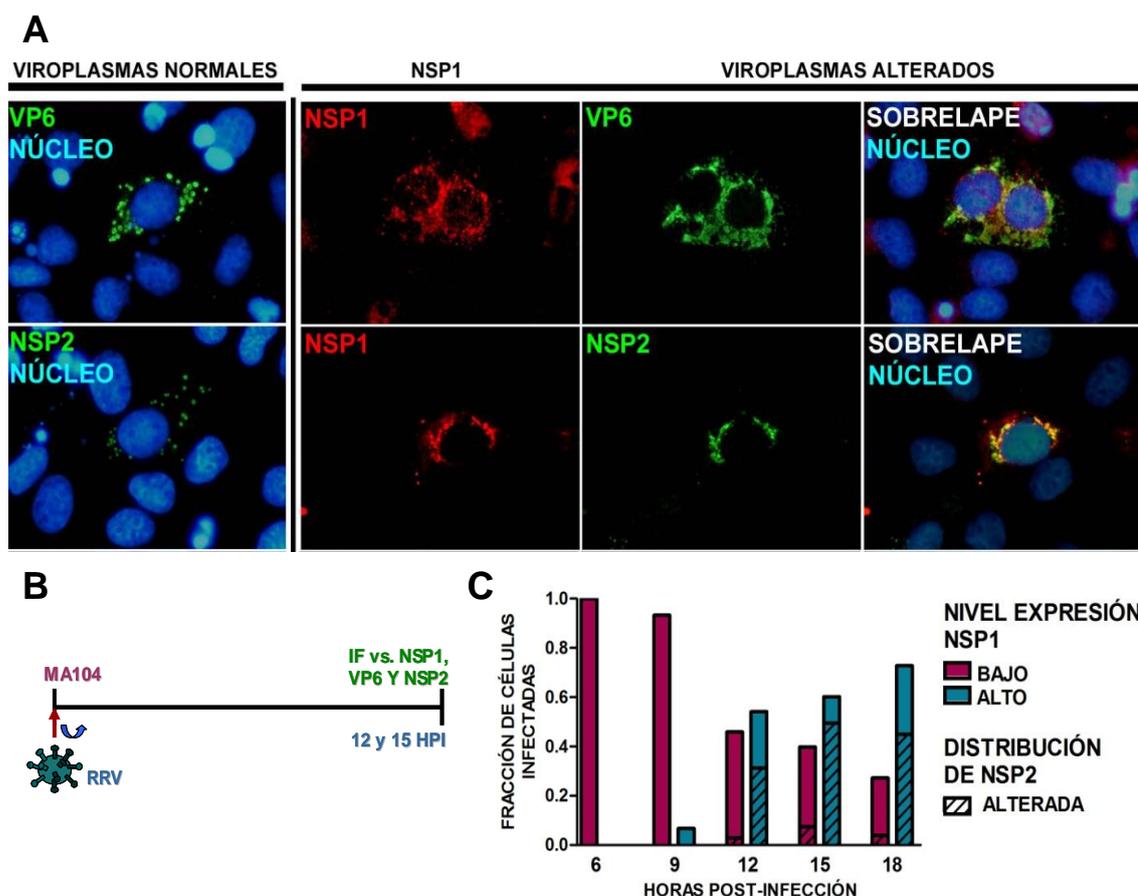


Fig. 24. Alto nivel de expresión de NSP1 correlaciona con distribución alterada de proteínas virales. **A:** Morfología característica de los viroplasmos en células MA104 infectadas con RRV (izquierda); distribución alterada de VP6 y NSP2 en células MA-104 infectadas con RRV que sobreexpresan NSP1 (derecha). **B:** Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 0.1 durante 1 hr; la infección se dejó proseguir hasta las 6, 9, 12, 15 o 18 hpi y las células fueron procesadas para su análisis mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra NSP1 (rojo) y NSP2 o VP6 (verde). **C:** Representación gráfica de los resultados del experimento; las células infectadas se clasificaron con base en el nivel de expresión de NSP1 y al fenotipo de distribución de NSP2; se utilizó una $n = 150$ para cada condición.

manera normal, estas proteínas se localizan mayoritariamente en viroplasmos formando estructuras esféricas bien definidas (Fig. 24A, izquierda), pero en células infectadas con alta expresión de NSP1 tanto VP6 como NSP2 forman estructuras irregulares y/o difusas, o presentan una distribución citoplásmica difusa muy marcada (Fig. 24A, derecha), lo cual denominamos distribución alterada. Decidimos determinar de manera cuantitativa a lo largo de la infección

de células MA-104 con RRV, si la aparición a tiempos tardíos post-infección de células con proteínas de viroplasma con morfología alterada coincidía con un alto nivel de expresión de NSP1. Se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 0.1, y a las 12 y 15 hpi se determinó la distribución de las proteínas VP6 y NSP2 en células con alta expresión de NSP1 (Fig. 24B). Encontramos que efectivamente las células con mayor nivel de expresión de NSP1 frecuentemente presentan viroplasma con morfología alterada, mientras que células con baja expresión de NSP1 no muestran alteraciones en dichas estructuras (Fig. 24B y 24C). Estos resultados sugieren que existe una correlación entre un alto nivel de expresión de NSP1 y morfología alterada de los viroplasma. Alteraciones en la morfología de los viroplasma podría ser indicativo de algún defecto en la replicación viral.

DETERMINACIÓN DE FACTORES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN Y/O DISTRIBUCIÓN DE NSP1

Con la finalidad de investigar qué factores podrían estar determinando la expresión y distribución diferencial de NSP1 a tiempos tardíos post-infección respecto de la expresión y distribución predominante a tiempos tempranos post-infección nos propusimos analizar el efecto de factores que afectan la infección viral y factores celulares o virales, sobre la expresión y distribución de NSP1. Entre los factores que afectan la infección viral estudiamos el efecto de la multiplicidad de infección (MOI), la sincronización de la infección, la replicación defectiva, y la apoptosis. Entre los factores virales y celulares estudiamos el efecto del proteasoma y el efecto del mRNA viral sobre la

expresión de NSP1 (Fig. 25). Los resultados obtenidos se describen en las secciones siguientes.

Efecto de factores que afectan la infección viral sobre la expresión y distribución de NSP1

Multiplicidad de infección y sincronización de la infección viral

El término multiplicidad de infección hace referencia al número de partículas infectivas por célula. Infecciones virales a multiplicidades de infección elevadas propician la generación de partículas defectivas que afectan la replicación viral. Las infecciones no productivas son un fenómeno común en virus que infectan animales, éstas pueden ocurrir por la generación de virus mutantes en los que una porción crítica del genoma ha sido eliminada de manera que se ha vuelto no funcional. El genoma resultante es defectivo en la replicación por lo que requiere de la presencia de virus silvestres (virus ayudantes) para poder replicarse. Para poder ser propagadas, dichas partículas

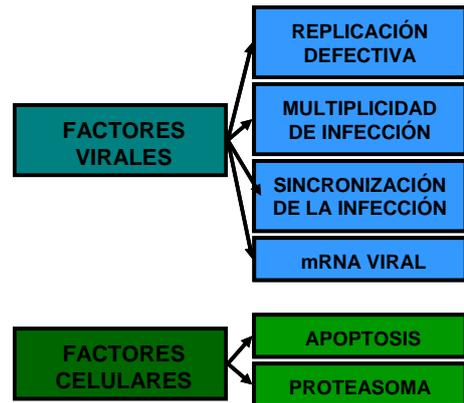


Fig. 25. Esquema de los factores que pueden afectar la expresión de NSP1.

defectivas interferentes deben poseer señales necesarias para la morfogénesis, empaquetamiento y replicación de su genoma. Estas partículas defectivas además interfieren con la replicación del virus ayudante en células coinfectadas por ambos, fenómeno conocido como interferencia; de ahí que este fenómeno cobre relevancia a multiplicidades de infección elevadas [93]. Por otra parte, resultados obtenidos en el laboratorio muestran que la sincronización de la infección viral puede repercutir sobre la replicación viral. En las infecciones por rotavirus, las partículas virales pueden quedar adsorbidas a la superficie celular e infectar a la célula aún luego de la remoción del inóculo viral. Para sincronizar la infección en nuestro sistema de células MA-104 infectadas con RRV decidimos utilizar un tratamiento con el anticuerpo neutralizante 4F8. El anticuerpo 4F8 es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP7 de rotavirus, localizada en la capa externa de la partícula viral. Este

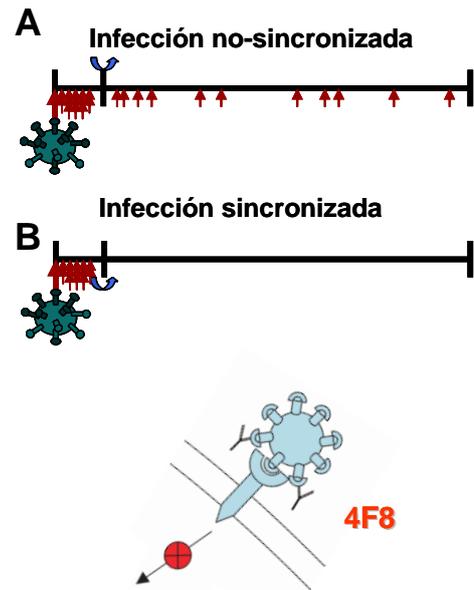


Fig. 26. Sincronización de la infección con el anticuerpo neutralizante 4F8. **A:** Representación esquemática de una infección no-sincronizada, en la cual ocurren infecciones extemporáneas aún luego de la remoción del inóculo, y de una infección sincronizada. **B:** El anticuerpo monoclonal neutralizante 4F8, descrito por Ruggeri y Greenberg [94], inhibe la entrada de rotavirus a la célula aún luego de la adsorción del virus a la superficie celular.

anticuerpo tiene la propiedad de que interfiere con la infección por rotavirus en un paso posterior a la adsorción viral, lo que representa un mecanismo poco frecuente de neutralización (Fig. 26) [94].

Para determinar la efectividad del tratamiento con el anticuerpo neutralizante 4F8 se determinó la infectividad residual mediante la técnica de titulación por inmunoperoxidasa, en células MA-104 infectadas con RRV luego del tratamiento con el anticuerpo monoclonal 4F8. Se infectaron células MA-104 con diluciones seriales de rotavirus RRV previamente activado con tripsina, manteniendo las células 90 min a 4 °C para permitir la adsorción del virus más no la penetración. Se añadieron distintas diluciones del anticuerpo monoclonal 4F8 (1:200, 1:1000 y 1:5000) durante 60 min a 4° C. Posteriormente se lavó exhaustivamente el anticuerpo 4F8 y se regresaron las células a incubación hasta las 15 hpi. A dicho tiempo se tiñeron las células por inmunoperoxidasa y

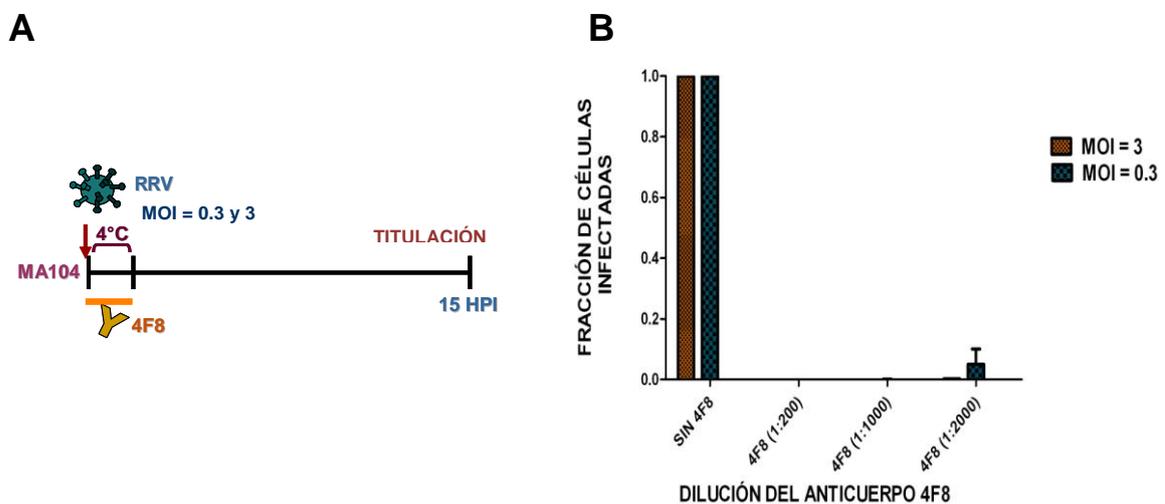


Fig. 27. Infectividad residual en células MA-104 infectadas con RRV luego del tratamiento con el anticuerpo monoclonal 4F8. A: Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a MOIs de 0.3 y 3 y se realizaron tratamientos de 1 hr con distintas diluciones del anticuerpo 4F8. La infectividad residual se calculó a las 15 hpi mediante titulación por formación de focos infecciosos. **B:** Representación gráfica de los resultados; se muestra la fracción de células infectadas (o infectividad residual) para cada condición del experimento los conteos de focos virales se realizaron tomando en cuenta las células no tratadas como el 100% de infectividad y calculando el porcentaje de infectividad con respecto al control del 100%.

se realizaron conteos de focos virales tomando a células no tratadas con el anticuerpo 4F8 como el 100% de infectividad; también se contabilizaron los focos virales para cada tratamiento y se calculó el porcentaje de infectividad con respecto al control (infectividad residual) (Fig. 27). Encontramos que el anticuerpo neutralizante 4F8 a una dilución 1:200 es capaz de inhibir eficientemente la entrada de RRV a células MA-104, por lo que puede emplearse para sincronizar la infección en nuestro sistema.

Con la finalidad de determinar si la MOI o la sincronización de la infección afectan la expresión de NSP1 decidimos analizar el efecto de la multiplicidad de infección sobre la expresión de NSP1 en infecciones sincronizadas con el anticuerpo neutralizante 4F8. Se infectaron células MA-104 con RRV a distintas MOIs y se incubaron las células durante 1 hr a 37 °C, 5% CO₂. Posteriormente se trataron las células infectadas con el anticuerpo neutralizante 4F8, en

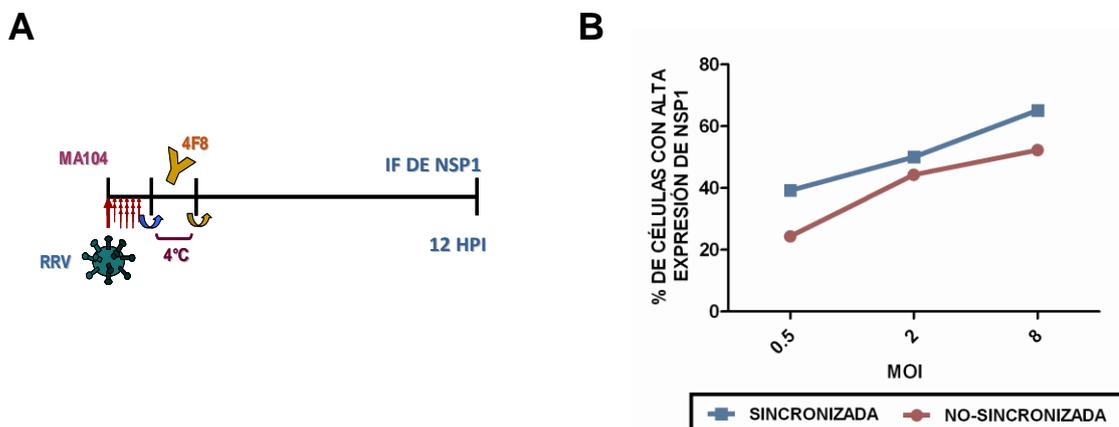


Fig. 28. Efecto de la MOI y la sincronización de la infección sobre el nivel de expresión de NSP1. A: Esquema del experimento: se infectaron células MA-104 con rotavirus RRV a MOIs de 0.5, 2 y 8 durante 1 hr, luego de lo cual se sincronizó la infección mediante tratamiento con el anticuerpo neutralizante 4F8; las muestras se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia y de manera cuantitativa se midió el nivel de expresión de NSP1 de cada célula infectada ($n \geq 50$) utilizando el software ImageJ 1.43u. **B:** Representación gráfica de los resultados, se graficó el porcentaje de células infectadas con alta expresión de NSP1 para cada condición.

dilución 1:200, durante 1 hr a 4 °C para sincronizar la infección, o con MEM-SS durante 1 hr a 4 °C para el control de infección no-sincronizada, luego de lo cual se regresaron las células infectadas a incubación a 37 °C hasta las 12 hpi (Fig. 28A). Las células infectadas fueron procesadas para su visualización mediante microscopía de epifluorescencia y se determinó la intensidad de la señal de NSP1 de manera cuantitativa, mediante densitometría utilizando el programa ImageJ 1.43u, para un mínimo de 50 células por condición. Se graficó el porcentaje de células con alta expresión de NSP1 a cada MOI tanto para el caso de una infección sincronizada como el de una no-sincronizada (Fig. 28B). Encontramos que la cantidad de células infectadas con alta expresión de NSP1 se incrementa aproximadamente un 27% al incrementar la MOI 16 veces tanto en la infección sincronizada como en la no-sincronizada. Estos resultados sugieren que el nivel de expresión de NSP1 se incrementa de forma proporcional a la MOI, es decir, al número de partículas virales que infectan una célula.

En infecciones sincronizadas observamos consistentemente mayor proporción de células con alto nivel de expresión de NSP1 a todas las MOI, a comparación con lo observado en infecciones no-sincronizadas. Estos resultados sugieren que las infecciones extemporáneas en el caso de infecciones no-sincronizadas disminuyen la expresión de NSP1. Puesto que se trata de un resultado preliminar, se vuelve necesario corroborar nuestras observaciones para obtener un resultado concluyente sobre el efecto de las infecciones extemporáneas sobre la expresión de NSP1.

Replicación defectiva

Resultados obtenidos en el laboratorio por Vallejo-Espí [95] sugieren que la distribución aberrante de proteínas virales es indicativa de replicación defectiva. Vallejo-Espí [95] encontró que en células BSC-1 infectadas con la cepa de rotavirus SA11 la proteína VP2, que normalmente se localiza en viroplasmos, y posee una distribución que Vallejo-Espí [95] describe como “difusa más agregados”, también puede tener una distribución denominada “solo difusa”, que correlaciona con defectos en la morfología de los viroplasmos. Puesto que los viroplasmos son los sitios donde ocurre la replicación del genoma y las fases iniciales de la morfogénesis, Vallejo-Espí [95] propone que la distribución “sólo difusa” de VP2 podría considerarse como un marcador de replicación defectiva.

Para investigar si la distribución aberrante de NSP1 a partir de las 12 hpi está

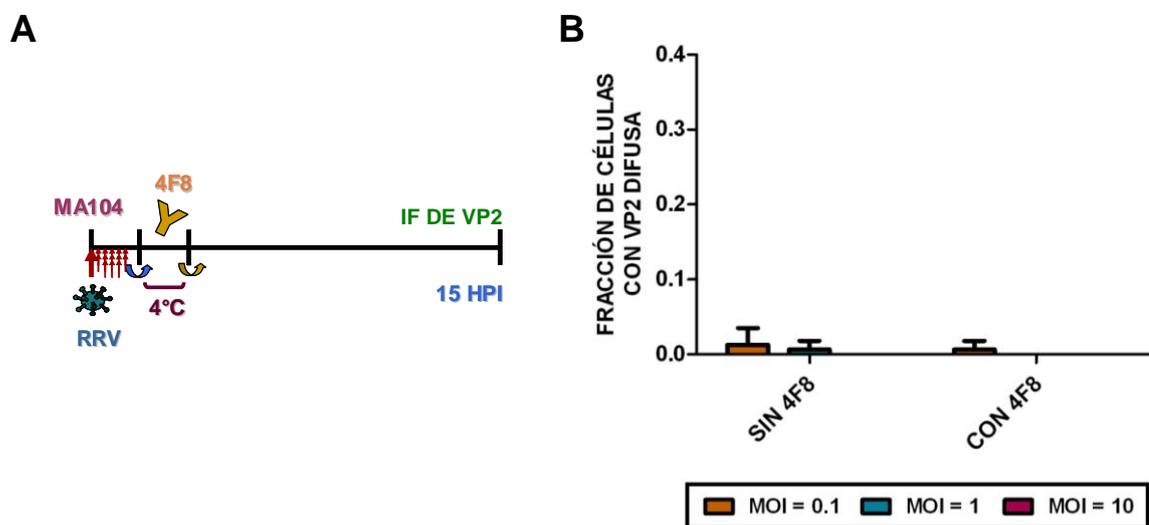


Fig. 29. VP2 como marcador de replicación defectiva en células MA-104 infectadas con RRV. A: Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a MOIs de 0.1, 1, y 10 durante 1 hr, y luego se sincronizó la infección tratando con el anticuerpo neutralizante 4F8; se dejó proseguir la infección hasta las 15 hpi y se analizaron las muestras mediante inmunofluorescencia. **B:** Representación gráfica de los resultados; se muestra la fracción de células con VP2 difusa para cada condición (resultados representativos de 2 experimentos independientes).

relacionada con replicación defectiva, primeramente decidimos analizar el efecto de la multiplicidad de infección sobre la distribución de NSP1 en infecciones sincronizadas con 4F8. Se infectaron células MA-104 con RRV a distintas multiplicidades de infección (0.1, 1 y 10) y se sincronizó la infección con el anticuerpo 4F8. Mediante microscopía de epifluorescencia se determinó si existía correlación entre la distribución de NSP1 y la distribución difusa de VP2 como marcador de replicación defectiva. El experimento se realizó por duplicado. A diferencia del hallazgo previo en infecciones de células BSC-1 con rotavirus SA11 que presentan distribución difusa de VP2, encontramos que una fracción insignificante de células MA-104 infectadas con RRV tiene distribución difusa (Fig. 29).

Para determinar si el fenotipo de distribución difusa de VP2 es exclusivo de la cepa SA11 realizamos un experimento en el que se infectaron células BSC-1 ya sea con rotavirus SA11 o con RRV, a distintas multiplicidades de infección (0.1, 1 y 10) sincronizando la infección con el anticuerpo 4F8 y se analizó el fenotipo de distribución de VP2 para ambos casos. Nuestros resultados sugieren que el patrón de distribución de VP2 no se comporta de la misma forma en infecciones con SA11 que en infecciones con RRV: en estas últimas sólo se observa el fenotipo de distribución de VP2 “difusa más agregados” y no el de VP2 difusa, mientras que en el caso de infecciones con SA11 si es posible obtener hasta aproximadamente un 30% de las células infectadas con distribución difusa de VP2 (Fig. 30).

A diferencia de lo que ocurre con SA11, nuestros resultados sugieren que VP2 no es un marcador fiable de replicación defectiva en infecciones con la cepa RRV de rotavirus.

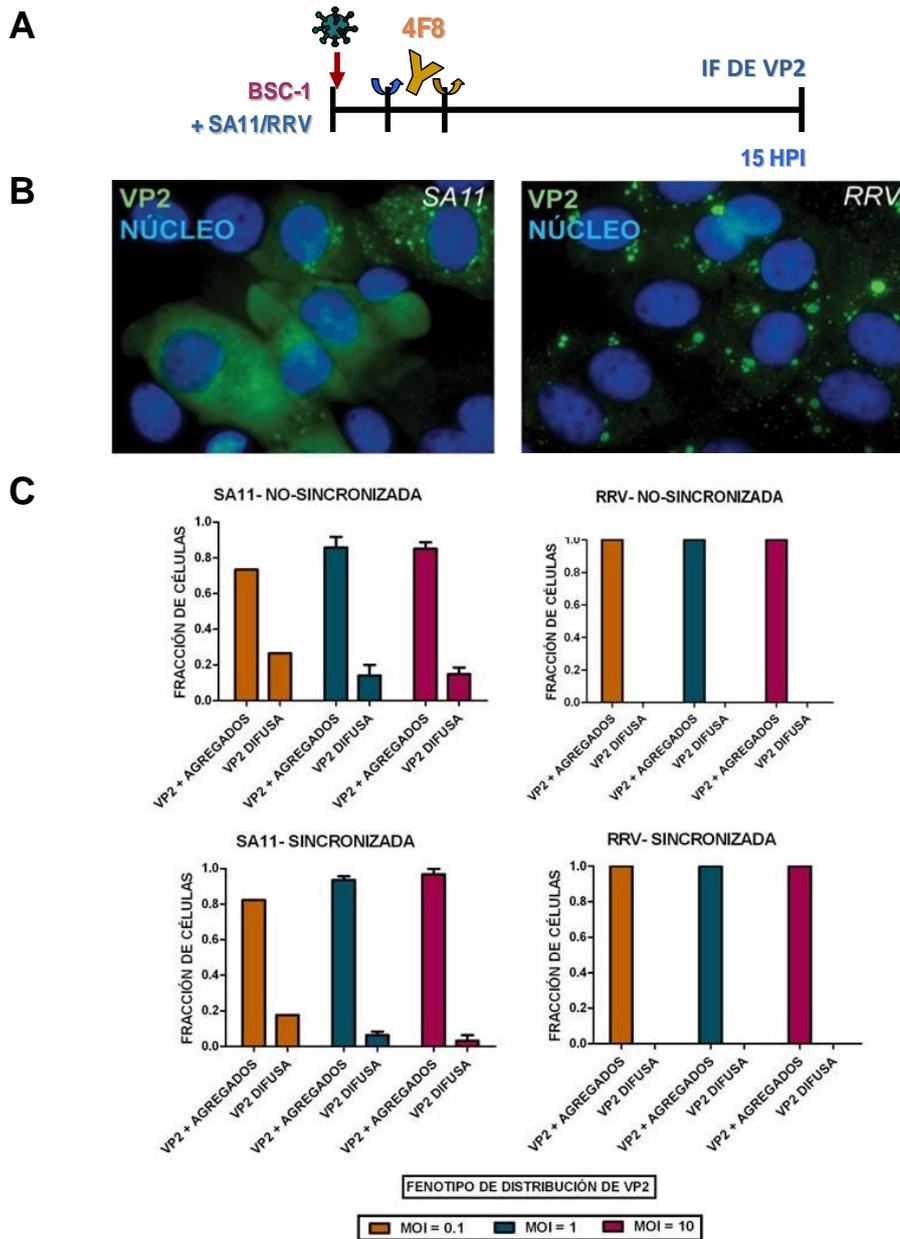


Fig. 30. La distribución de VP2 no es un marcador de replicación defectiva en células MA-104 infectadas con RRV. A: Esquema del experimento; se infectaron células BSC-1 con RRV o SA11 a MOIs de 0.1, 1 y 10 durante 1 hr y posteriormente se sincronizó la infección mediante tratamiento con el anticuerpo neutralizante 4F8; se dejó proseguir la infección hasta las 15 hpi y las muestras se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra VP2. **B:** Distribución representativa de VP2 en células BSC-1 infectadas con SA11 (izquierda) o con RRV (derecha). **C:** Representación gráfica de los resultados; se muestra la fracción de células infectadas con el fenotipo de VP2 “difusa más agregados” o “sólo difusa” para cada condición; se contabilizaron las células infectadas de 20 campos ($n \geq 50$) por condición.

Apoptosis

Estudios con líneas intestinales humanas muestran que ocurre inducción de apoptosis luego de infección con rotavirus [85, 86]. Puesto que nuestros resultados muestran que células con alta expresión de NSP1 suelen presentar distribución aberrante de otras proteínas virales y además frecuentemente presentan alteraciones en la morfología del núcleo, nos propusimos investigar si estos cambios podrían ser causados por activación de apoptosis en la célula. Para ello utilizamos a la proteína lamina como marcador de apoptosis puesto que se ha reportado que ocurre degradación de lamina de 1-3 hrs después de la inducción de apoptosis [96]. Para comprobar que la degradación de lamina es un marcador de apoptosis, se trataron células MA-104 con TNF- α (20 ng/mL), que se sabe induce apoptosis [97], durante 15 hrs. Mediante inmunofluorescencia indirecta se visualizaron el estado de la proteína lamina y el estado del núcleo mediante tinción con DAPI (Fig. 31A). Encontramos que en nuestro sistema de células MA-104 la degradación de lamina no funciona como marcador de apoptosis (Fig. 31A), a diferencia de lo reportado para la línea celular de humano KE37 [96]. Este resultado es congruente con nuestras observaciones sobre el estado de la proteína lamina en células infectadas que muestran alta expresión de NSP1 a las 15 hpi, en las que no encontramos correlación entre la degradación de lamina y una alta expresión de NSP1. En la Fig. 31B se muestran células con alta expresión de NSP1 es posible observar una mayor cantidad de lamina que en otras células (columna izquierda, asterisco), células con baja expresión de NSP1 pero mayor cantidad de lamina en su membrana nuclear (columna central y columna derecha, flechas blancas)

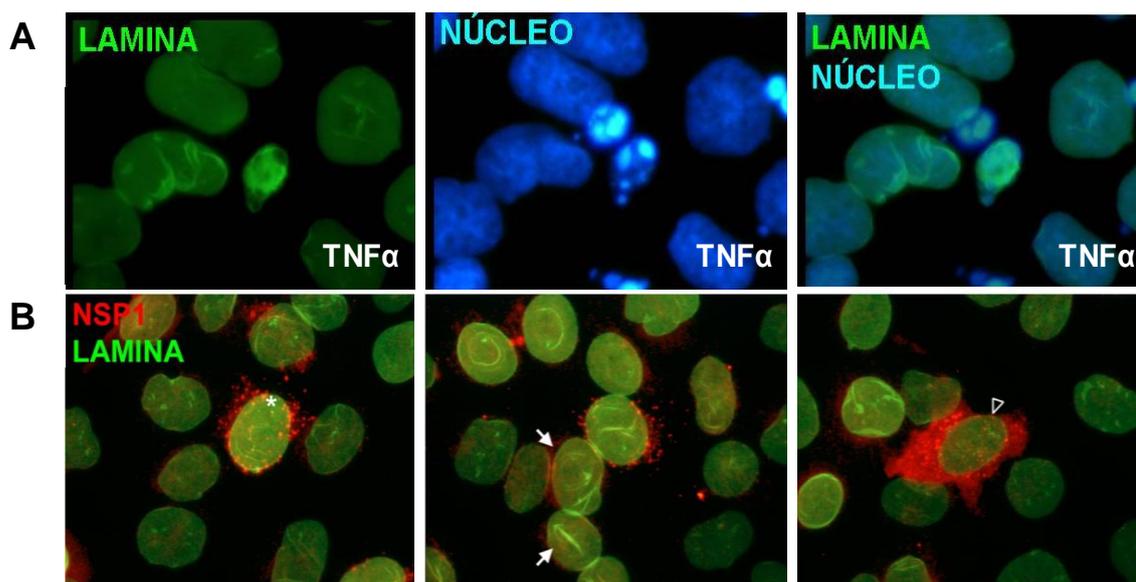


Fig. 31. Relación entre la degradación de lamina como marcador de apoptosis y la expresión de NSP1. A: Estado de la proteína lamina en células MA-104 infectadas con RRV que expresan distintos niveles de NSP1. **B:** Estado de la proteína lamina en células MA-104 tratadas con TNF- α (20 ng/mL) para inducir apoptosis. El asterisco indica células que sobreexpresan NSP1 y lamina; la cabeza de flecha hueca indica células que sobreexpresan NSP1 pero con baja expresión de lamina; las flechas blancas indican células con baja expresión de NSP1 y alta expresión de lamina.

y células que sobreexpresan NSP1 pero que no muestran una mayor cantidad de lamina (columna derecha, flecha hueca).

Efecto de factores virales y celulares sobre la expresión y distribución de NSP1

Efecto del proteasoma sobre la expresión de NSP1

Resultados obtenidos en el laboratorio por la M. en C. Piña-Vázquez [58] muestran que la proteína NSP1 recombinante expresada en células BSC-1 mediante el sistema del virus vaccinia es sensible a degradación por el proteasoma y que inhibir la función del proteasoma mediante tratamiento con el inhibidor irreversible CLL (cisto-lactacistina- β lactona) incrementa la cantidad de NSP1 hasta por 4 veces [58]. Una posible explicación a la

distribución en cúmulos de NSP1 consiste en suponer que un incremento en la cantidad de proteína podría ocasionar que ésta se agregara y formara cúmulos. Por tanto, tratar las células infectadas con RRV con el inhibidor del proteasoma CLL debería incrementar la cantidad de NSP1 en dichas células y quizá exacerbar el fenotipo de distribución de NSP1 en cúmulos.

Primero se evaluó la efectividad de la droga inhibidora del proteasoma CLL en nuestro sistema de células MA-104. Contin *et al.* [98] reportaron que en etapas tempranas del ciclo replicativo de rotavirus se requiere del proteasoma para el ensamblaje de los viroplasmos. Por tanto se determinó el efecto inhibidor del proteasoma CLL, de manera indirecta, evaluando su efecto sobre la formación de viroplasmos. Para ello se infectaron células MA-104 con RRV y a la hora post-infección se trataron las células con CLL (10 μ M) durante 3 hrs; a las 8 hpi se procesaron las muestras para su visualización mediante microscopía de epifluorescencia y se determinó el efecto de las drogas sobre el número y tamaño de los viroplasmos (Fig. 32A). Se encontró que el CLL disminuye el número y tamaño de los viroplasmos (Fig. 32B). Por tanto podemos concluir que el CLL a una concentración de 10 μ M inhibe efectivamente el proteasoma. Para investigar si el proteasoma afecta la expresión o formación de cúmulos de NSP1 se infectaron células MA-104 con rotavirus RRV a una MOI de 0.1 y se realizaron tres tratamientos diferentes con CLL (10 μ M): adicionar el CLL 6 hrs, 2 hrs o 30 min antes de las 15 hpi y posteriormente se evaluó si existía efecto del tratamiento sobre la localización en cúmulos de NSP1 y sobre el nivel de expresión de la proteína mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 33A). El experimento se realizó por duplicado. Encontramos que existe una tendencia creciente a incrementarse la distribución de NSP1 en cúmulos a mayor tiempo

de tratamiento con CLL, llegando a ser casi 5% mayor con 6 hrs de tratamiento con CLL (Fig. 33B). Consideramos que la técnica empleada no es suficientemente sensible para que nuestro resultado sea contundente, por ello decidimos corroborar nuestras observaciones decidimos evaluar el efecto del proteasoma sobre la expresión de NSP1 mediante Western-blot, técnica que nos permite una detección más sensible del nivel de expresión de la proteína. Como control del efecto inhibitor del proteasoma de las drogas CLL y MG132, y en base a los resultados publicados por Contin *et al.* [98], en los que se muestra que el proteasoma es requerido para la formación de viroplasmos y que tratamiento con distintos inhibidores del proteasoma disminuye la expresión de la proteína de viroplasmos NSP2. Se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 10 y a la hora post-infección se trataron las células con CLL (10 μ M) o MG132 (50 μ M) durante 4 hrs. A las 9 hpi se determinó el efecto de la inhibición del

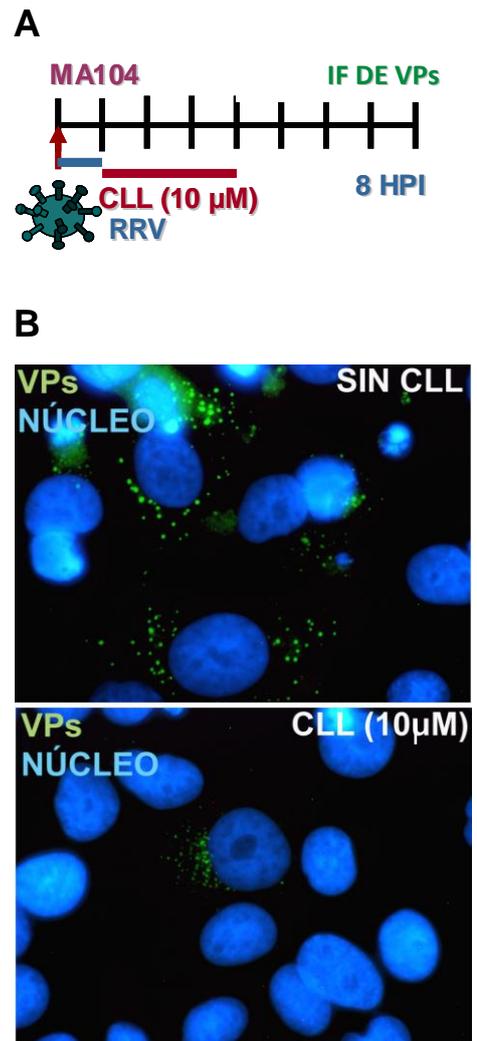


Fig. 32. Evaluación del inhibidor del proteasoma CLL. **A:** Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 0.5 durante 1 hr y se adicionó CLL (10 μ M) durante 3 hrs; a las 8 hpi se analizaron las muestras mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra VP6 para visualizar los viroplasmos (verde); el núcleo se muestra en azul. **B:** Imágenes representativas de células infectadas con RRV tratadas con DMSO (arriba) y células infectadas con RRV tratadas con CLL (10 μ M) (abajo).

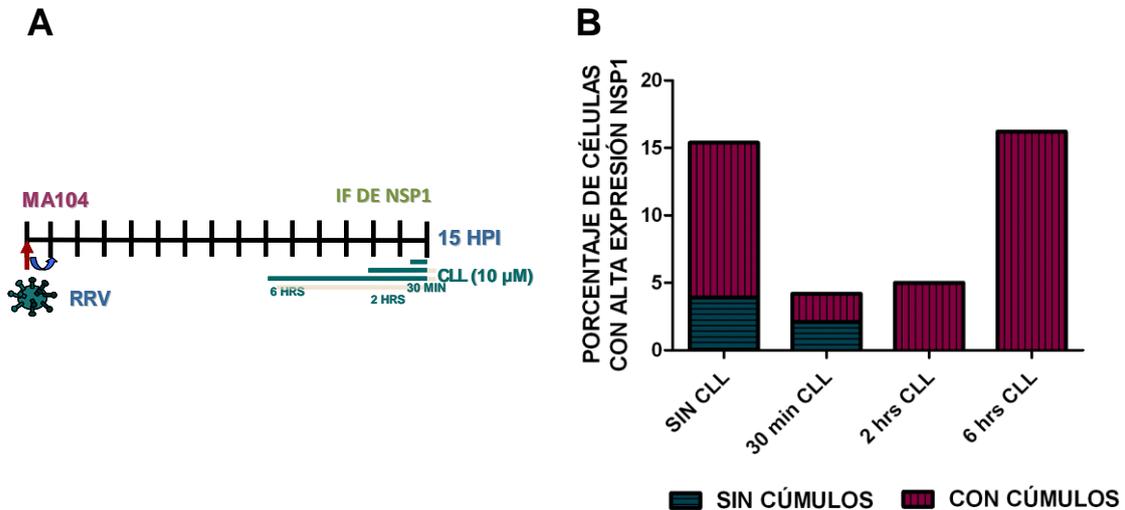


Fig. 33. Efecto del proteasoma sobre la distribución de NSP1. **A:** Esquema del experimento: se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 0.1 durante 1 hr y se realizaron tratamientos con CLL (10 μ M) durante 30 min, 2 hrs o 6 hrs para inhibir el proteasoma; a las 15 hpi se analizaron las muestras mediante inmunofluorescencia. **B:** Representación gráfica de los resultados; se clasificaron las células con alta expresión de NSP1 de acuerdo a la presencia de cúmulos de NSP1.

proteasoma sobre la expresión de la proteína NSP2, esencial para la formación de viroplasmias (Fig. 34A). Encontramos que ambas drogas disminuyen la expresión de NSP2 (Fig. 34B y 34C), de manera congruente con lo reportado por Contin *et. al.*, por lo que podemos concluir que ambas drogas inhiben el proteasoma de manera efectiva.

Para determinar el efecto del proteasoma sobre la expresión de NSP1 se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 10 y a la hora post-infección se removió el inóculo viral. A las 7 hpi y a las 10 hpi se realizaron tratamientos con CLL (10 μ M) o con MG132 (50 μ M) durante 5 hrs y 2 hrs con las drogas y se dejó proseguir la infección hasta las 9 hpi, momento en el cual se procesaron las muestras para su análisis mediante Western-blot (Fig. 34D). En la Fig. 34(E-H) se muestra el nivel de expresión de NSP1 para cada condición experimental. Estos resultados sugieren que los tratamientos con cualquiera

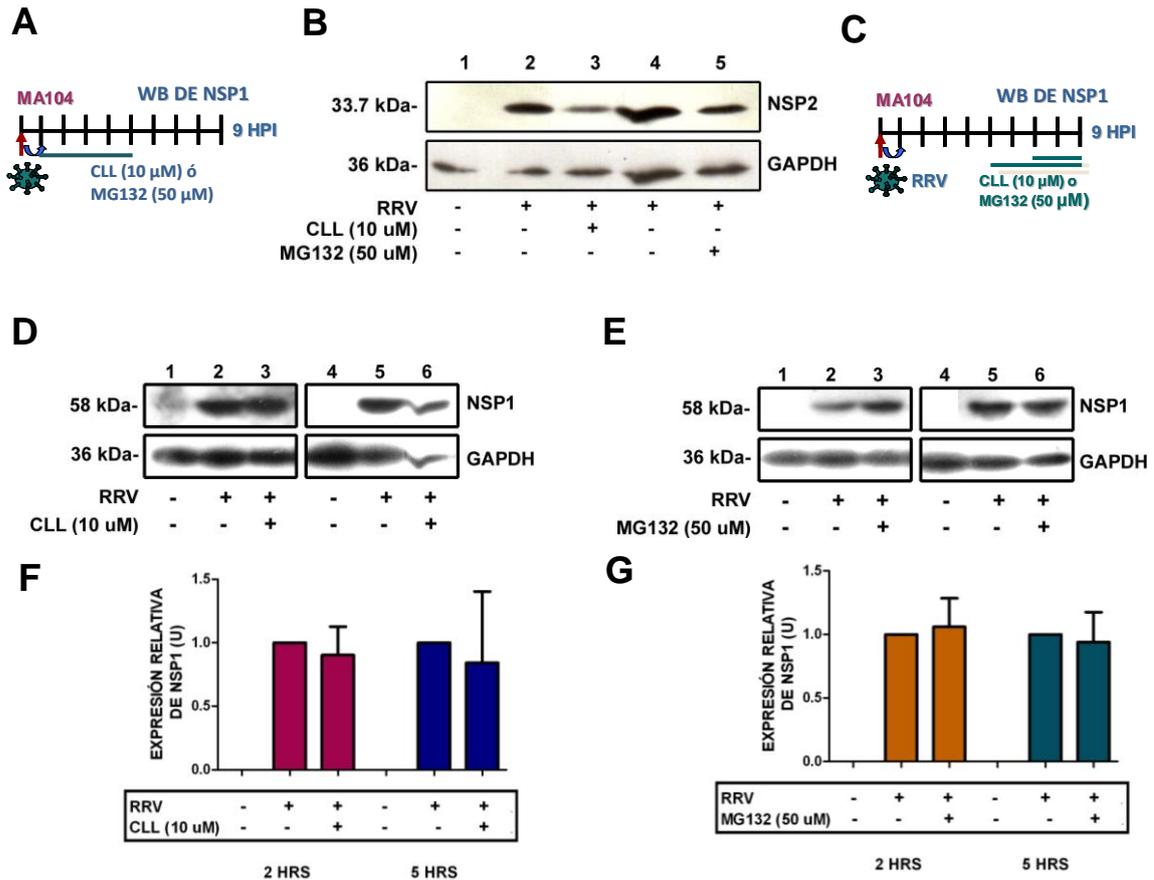


Fig. 34. Efecto del proteasoma sobre el nivel de expresión de NSP1. **A:** Esquema del experimento: se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 10 durante 1 hr y a la hora post-infección se trataron con CLL (10 μ M), MG132 (50 μ M) o DMSO durante 4 hrs; las muestras se procesaron para su análisis mediante Western-blot a las 9 hpi; las membranas se incubaron con anticuerpos contra NSP2 y GAPDH. **B:** Western-blot de los lisados celulares obtenidos a partir de células infectadas con RRV y tratadas como se ilustra en el esquema del panel A. **C:** Esquema del experimento: se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 10 durante 1 hr y se realizaron tratamientos de 2 hrs y de 5hrs con los inhibidores del proteasoma CLL (10 μ M) o MG132 (50 μ M), o con DMSO; a las 9 hpi se procesaron las muestras para su análisis mediante Western-blot; las membranas se incubaron con anticuerpos contra NSP1 y GAPDH (como control de carga). **D y E:** Western-blot de los lisados celulares obtenidos a partir de células infectadas con RRV y tratadas con CLL (10 μ M) o MG132 (50 μ M) para inhibir el proteasoma; se muestran las bandas correspondientes a NSP1 y GAPDH; 1-3: tratamiento de 2 hrs con la droga correspondiente; 4-6: tratamiento de 5 hrs con al droga correspondiente. **F y G;** Representación gráfica de los resultados mostrados en A y B; los resultados obtenidos se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH; se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

de las drogas no afectan la expresión de NSP1 bajo las condiciones ensayadas (Fig. 34E-H).

Efecto del mRNA viral sobre la expresión de NSP1

NSP1 es capaz de unir de manera específica el extremo 5' de los mRNAs de rotavirus [28]. Además, resultados previos obtenidos en el laboratorio muestran que la transfección con mRNA total de rotavirus (mRNA_{RRV}) estabiliza a la proteína y evita que sea degradada por el proteasoma, por lo que en consecuencia se incrementa su nivel de expresión [58]. Para determinar si el mRNA_{RRV} afecta el nivel de expresión de NSP1 en el contexto de la infección viral, se transfectaron con mRNA_{RRV} células MA-104 previamente infectadas con RRV. Utilizamos mRNA_{RRV} disponible en el laboratorio, producido por la M. en C. Piña-Vázquez mediante transcripción *in vitro* a partir de DLPs de rotavirus tal y como se describió anteriormente [58]. Con la finalidad de confirmar la calidad de dicho mRNA_{RRV} se transfectaron células MA-104 con 750 ng, 1.5 o 3 µg de mRNA_{RRV} y a distintos tiempos (6, 9, 12 y 15 horas post-

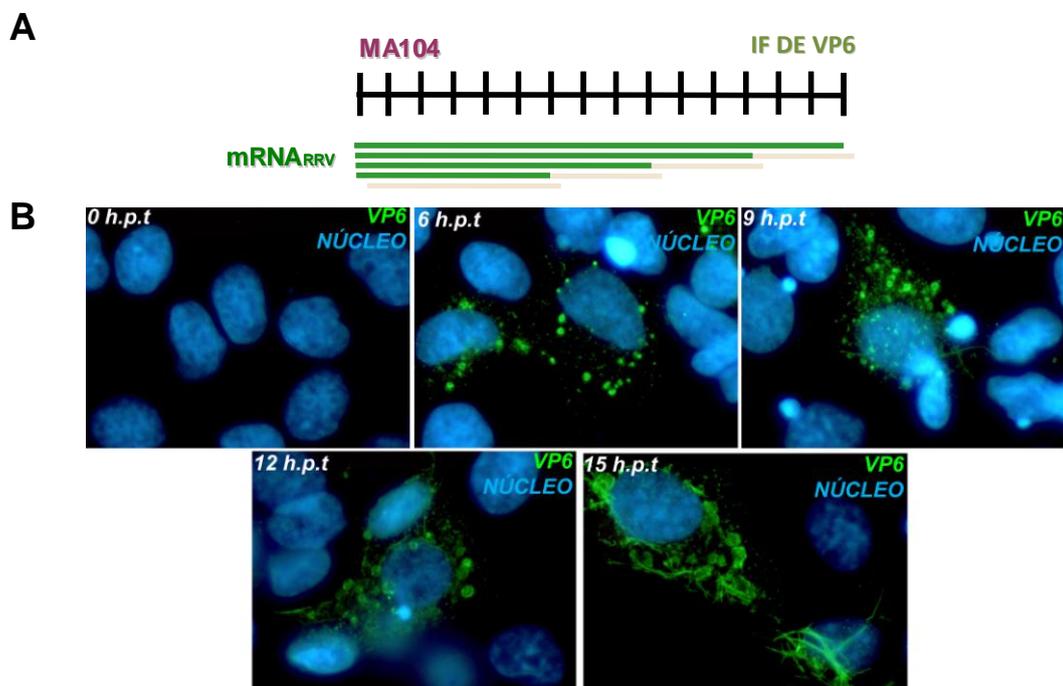


Fig. 35. Evaluación de la calidad del mRNA_{RRV}. **A:** Esquema del experimento; se transfectaron células MA-104 con 0.75 µg, 1.5 µg o 3 µg por pozo de mRNA_{RRV} y las células se analizaron mediante inmunofluorescencia a las 6, 9, 12 o 15 hpt utilizando un anticuerpo contra VP6 (verde). **B:** Resultados representativos de la transfección de mRNA_{RRV} (3 µg/pozo) a células MA-104.

transfección) se determinó la capacidad de dicho mRNA_{RRV} para ser traducido evaluando la expresión de la proteína VP6 mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 35A).

Encontramos que para todas las condiciones probadas se obtiene una expresión adecuada de la proteína VP6, obteniendo una máxima eficiencia de transfección, de aproximadamente el 20% del total de células, con 3 µg de mRNA_{RRV} por pozo. En la Fig. 35B se muestran imágenes representativas del resultado de la transfección de 3 µg de mRNA_{RRV} por pozo. Una vez corroborada la integridad del mRNA_{RRV} procedimos a determinar su efecto sobre la expresión de NSP1.

Primero determinamos el efecto de transfectar mRNA_{RRV} durante las fases tempranas de la infección con rotavirus sobre la expresión de NSP1. Se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 1 y a la hora post-infección se transfectaron 3 µg/pozo de mRNA_{RRV}; a las 9 hpi se analizaron las muestras mediante microscopía de epifluorescencia para evaluar el efecto del mRNA_{RRV} sobre la expresión y distribución de NSP1 (Fig. 36A). En la Fig. 36B se muestran imágenes representativas de nuestros resultados. En el panel 1 se muestra el control de células no infectadas, ni transfectadas con mRNA_{RRV}. En el caso de células transfectadas con mRNA_{RRV}, condición correspondiente al control de señal de fondo, obtenemos expresión significativa de la proteína traducida a partir del mRNA_{RRV}, pero con una distribución intracelular diferente, en la que la proteína se localiza de forma marcadamente perinuclear sin distribución citoplásmica (Fig. 36B. panel 2). En células infectadas con RRV que no fueron transfectadas con mRNA_{RRV} observamos baja expresión de NSP1 con el patrón característico de distribución descrito anteriormente, en el

que la proteína se encuentra de forma difusa en el citoplasma, con distribución preferentemente perinuclear (Fig. 36B, panel 3). Finalmente, en células infectadas con RRV y transfectadas con mRNA_{RRV} se observó que el nivel de expresión de NSP1 no se altera de forma significativa, mientras que su distribución intracelular cambia de manera tal que ya no se observa la distribución citoplásmica difusa y preferentemente perinuclear característica de células infectadas, sino que muestra una distribución marcadamente perinuclear similar a la que se observa en células no infectadas transfectadas con mRNA_{RRV} (Fig. 36B, panel 4). Lo anterior, aunado a observaciones de que la transfección prolongada de mRNA_{RRV} también afecta la expresión de otras proteínas virales (no se muestra), nos hace suponer que las condiciones del experimento afectan la replicación viral y se vuelve necesario optimizarlas para minimizar efectos que podrían dificultar la determinación del efecto del mRNA_{RRV} sobre la expresión de NSP1.

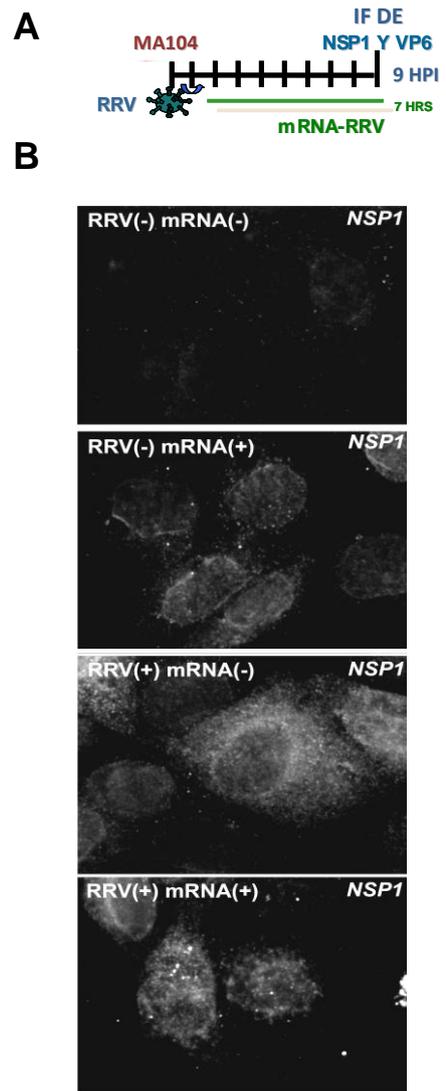


Fig. 36. Efecto sobre la expresión de NSP1 de la transfección de mRNA_{RRV} durante las fases tempranas de la infección con RRV. **A:** Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 1 durante 1 hr, y se transfectaron mRNA_{RRV} (3 µg/pozo) a las 3 hpi; la infección se dejó proseguir hasta las 9 hpi y se analizaron las células mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra NSP1. **B:** Imágenes representativas de los resultados obtenidos para la expresión de NSP1 (blanco) bajo cada condición.

Decidimos probar el efecto sobre la expresión de NSP1 de transfectar mRNA_{RRV} durante un período de tiempo menor, de 2 hrs, para disminuir el ruido de fondo producto de la expresión de NSP1 a partir del mRNA_{RRV} y para evitar efectos adversos sobre la replicación viral. Se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 1 y a las 7 hpi se transfectaron 3 µg de mRNA_{RRV} o de mRNA_{luciferasa} como control, dejando proseguir la infección hasta las 9 hpi; las células se procesaron para su análisis mediante inmunofluorescencia y mediante densitometría se determinó el efecto del mRNA_{RRV} sobre la expresión de NSP1 midiendo la intensidad de la señal de NSP1 en todas las células infectadas de 10 campos para cada condición (Fig. 37A). En la Fig. 37B se muestran imágenes representativas de nuestros resultados, los cuales se grafican en la Fig. 37C. El control negativo de nuestro experimento, consistente en células MA-104 sin infectar y sin transfectar, se muestra en la Fig. 37B, panel 1. Las células transfectadas con mRNA_{RRV} o mRNA_{luciferasa} muestran baja señal de ruido de fondo (Fig. 37B, paneles 2 y 3 y Fig. 37C). En células infectadas y transfectadas con mRNA_{luciferasa} observamos la distribución normal de NSP1, difusa en el citoplasma (Fig. 37B, panel 4). En cambio, en las células infectadas con RRV y transfectadas mRNA_{RRV} no observamos cambios en la distribución intracelular de NSP1. En todas las repeticiones del experimento observamos un incremento en la expresión de la proteína (Fig. 37B, panel 5), aunque la magnitud de dicho incremento es variable por lo que al calcular la desviación estándar la barra de error resultante es amplia (Fig. 37C). Esto sugiere que otros factores podrían estar influyendo sobre la expresión de NSP1 bajo nuestras condiciones experimentales. Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia sugieren que, en determinadas condiciones, la

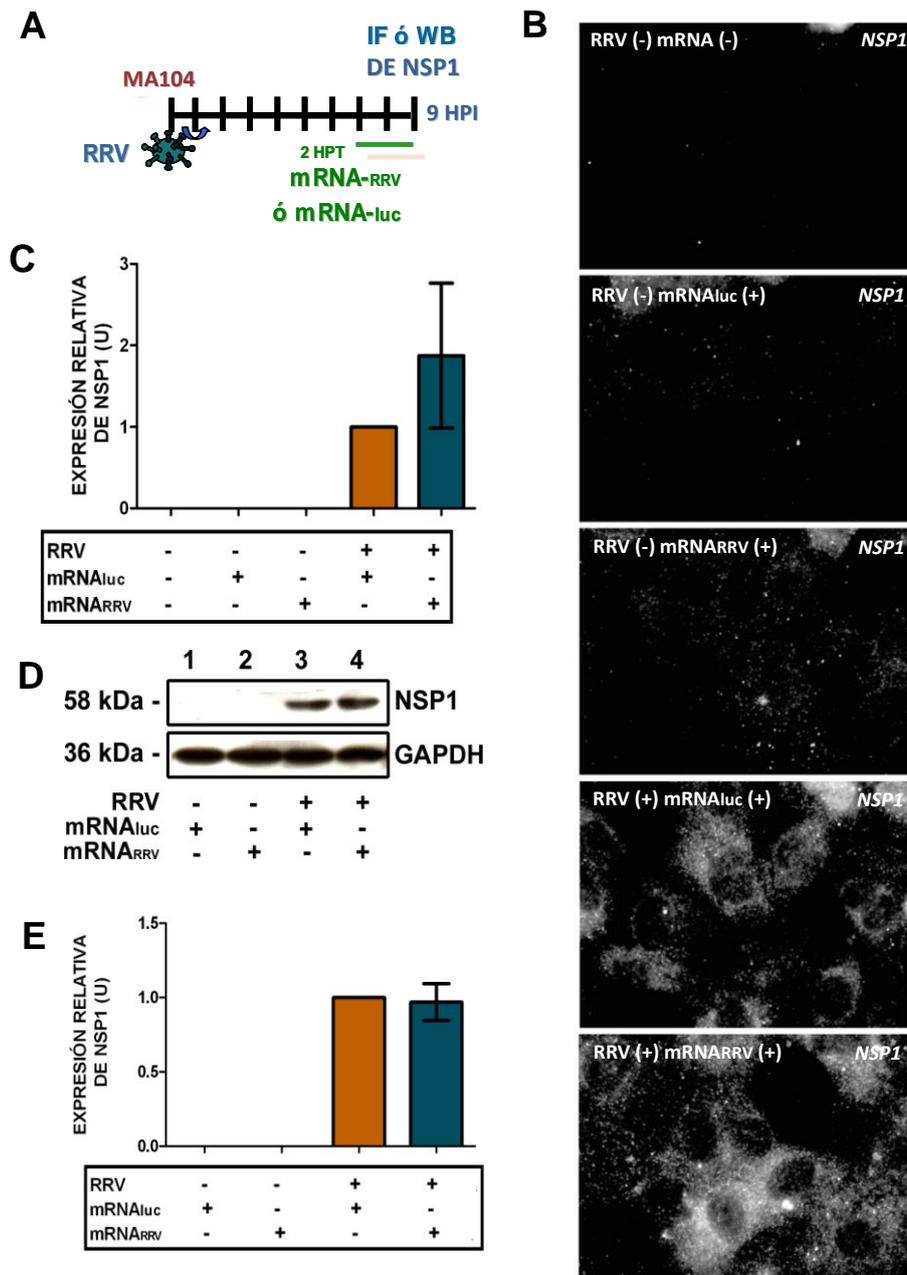


Fig. 37. Efecto de la transfección de mRNA_{RRV} sobre la expresión de NSP1. **A:** Esquema del experimento; se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 1 durante 1 hr, y se transfeció mRNA_{RRV} a las 7 hpi; la infección se dejó proseguir hasta las 9 hpi y se analizaron las células mediante inmunofluorescencia o mediante Western-blot utilizando un anticuerpo contra NSP1. **B:** Efecto de la transfección de mRNA_{RRV} sobre la expresión de NSP1 mediante inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos para la expresión de NSP1 (blanco) bajo cada condición; se determinó de manera cuantitativa el nivel de expresión de NSP1 para un mínimo de 15 campos por condición. **C:** Representación gráfica de los resultados mostrados en el panel B, la gráfica muestra el resultado de 3 experimentos independientes. **D:** Efecto de la transfección de mRNA_{RRV} sobre la expresión de NSP1 mediante Western-blot. Se muestran Western-blot representativos de los lisados celulares obtenidos a partir de células infectadas con RRV y transfectadas con mRNA_{RRV} o mRNA_{luc} como control, se muestran las bandas correspondientes a NSP1 y GAPDH. **E:** Representación gráfica de los resultados mostrados en el panel D; se muestra el resultado de 3 experimentos independientes.

transfección de mRNA_{RRV} podría incrementar la expresión de NSP1 en células infectadas con RRV.

Con la finalidad de corroborar estos resultados evaluamos el efecto de la transfección de mRNA_{RRV} sobre la expresión de NSP1 en células infectadas con RRV mediante Western-blot. Para ello se infectaron células MA-104 con RRV a una MOI de 10 y a la hora post-infección fue removido el inóculo viral. A las 7 hpi se transfectaron 100 ng/μL de mRNA_{RRV}, o mRNA_{luciferasa} como control, y a las 9 hpi se procesaron las muestras para su análisis mediante Western-blot (Fig. 37A). Los resultados muestran que, bajo las condiciones ensayadas, no existe efecto significativo de la transfección de mRNA_{RRV} sobre el nivel de expresión de NSP1 (Fig. 37D y Fig. 37E). Sería conveniente explorar distintas condiciones experimentales para determinar si la transfección de mRNA_{RRV} afecta la expresión de NSP1 mediante Western-blot, tales como distintas concentraciones de mRNA_{RRV} y diferentes tiempos de transfección.

DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA NSP1 RECOMBINANTE EXPRESADA MEDIANTE EL SISTEMA DE VACCINIA RECOMBINANTE EN CÉLULAS BSC-1

Para determinar si la distribución de NSP1 depende de factores virales expresamos a la proteína recombinante NSP1 de RRV mediante el sistema de vaccinia recombinante y analizamos su distribución mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 39A). La proteína NSP1 recombinante muestra una distribución citoplásmica difusa, con la presencia de cúmulos con forma irregular (Fig. 39B). Con el sistema de vaccinia recombinante se obtiene un mayor nivel de expresión de NSP1 en comparación con la NSP1 que se expresa en células infectadas con rotavirus, lo que permite una mejor detección

de la proteína. Además, para el caso de la proteína recombinante los cúmulos de NSP1 son en general más grandes e intensos que los que se observan en células infectadas con rotavirus. En el caso de la proteína recombinante no se observa una localización preferente en la región perinuclear de la célula, sino que se encuentra distribuida de manera homogénea en el citoplasma. Asimismo, la distribución de la proteína es homogénea, en contraste con el patrón punteado característico de la proteína en el contexto de la infección viral. Estos resultados sugieren que la distribución perinuclear y el patrón punteado de NSP1 podrían estar determinados por factores virales.

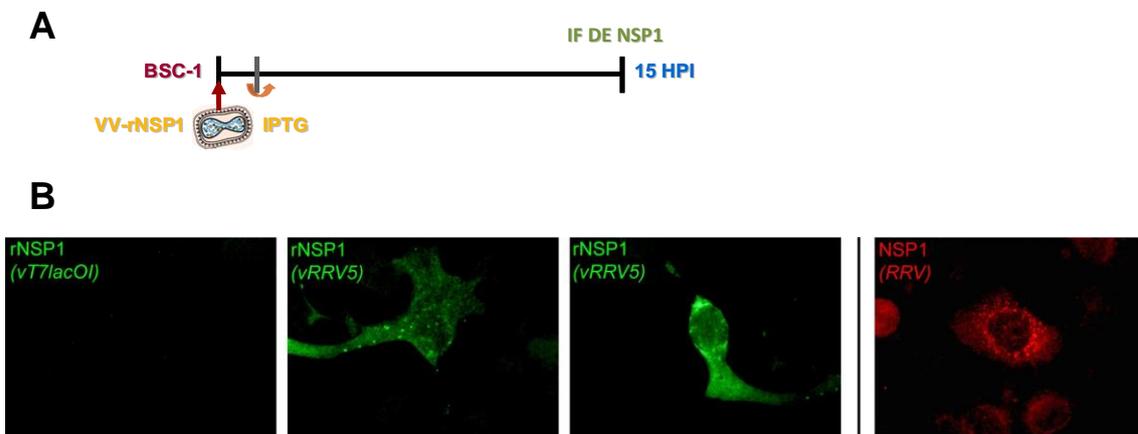


Fig. 38. Distribución intracelular de NSP1 fuera del contexto de la infección viral.
A: Esquema del experimento; se infectaron células BSC-1 con vNSP1 a una MOI de 1 durante 1 hr y se indujo la expresión de rNSP1 agregando IPTG (1 mM); a las 15 hpi se analizaron las muestras mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra NSP1. **B:** Células BSC-1 infectadas con el virus vaccinia vT7lacOI que no expresa la proteína rNSP1 (panel 1); células BSC-1 infectadas con el virus vaccinia vNSP1 que expresa la proteína rNSP1 (paneles 2 y 3); distribución general de la proteína NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV (panel 4).

DISCUSIÓN

ESTABLECIMIENTO DE LA METODOLOGÍA PARA DETECTAR A **NSP1 DE ROTAVIRUS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO**

El estudio de la función de NSP1 de rotavirus ha sido obstaculizado por la dificultad para detectar a esta proteína en células de mamífero infectadas con rotavirus. Estudios previos en el laboratorio sugieren que esta dificultad se debía a dos causas: el bajo nivel de expresión de NSP1 y la baja especificidad de sueros hiperinmunes producidos contra NSP1 recombinante, producida en bacterias, contra la proteína nativa. Para contender con esta dificultad, se produjeron previamente en el laboratorio 12 sueros hiperinmunes producidos contra un péptido derivado de los 21 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal de NSP1 de RRV, o contra dos formas de NSP1 recombinante de RRV producida en bacterias: ya sea la forma insoluble derivada de cuerpos de inclusión, o la forma obtenida de bandas de gel de poliacrilamida SDS, obtenida también a partir de los citados cuerpos de inclusión. Aunque ambas formas de NSP1 derivadas de cuerpos de inclusión bacterianos muy probablemente consisten de proteína desnaturalizada, se esperaba que difirieran en su especificidad contra NSP1 nativa debido a diferencias en su grado de pureza y en el grado en el que reconocen los epítomos lineales que predominan en proteínas desnaturalizadas.

En este estudio se determinó la capacidad de los 12 sueros hiperinmunes anti-NSP1 para detectar a la proteína por inmunofluorescencia en células infectadas con rotavirus y se identificó un suero de cuyo, inmunizado con NSP1 obtenida cortando una banda de un gel de poliacrilamida SDS, capaz de reconocer a la

proteína nativa. La señal obtenida con el anticuerpo es de muy baja intensidad durante la fase replicativa de las infecciones virales, mientras que si se usa muy concentrado el anticuerpo, revela algún grado de inespecificidad. A pesar de lo anterior, fue el único suero de entre los 12 probados capaz de detectar a NSP1 nativa. Consideramos que la dificultad técnica para detectar a NSP1 se debe a su bajo nivel de expresión y a que no hemos logrado producir anticuerpos que detecten eficientemente a NSP1 en estado nativo, es decir, nuestra fuente de antígeno es proteína en alguna conformación distinta a la nativa.

NSP1 TIENE BAJA EXPRESIÓN DURANTE LA REPLICACIÓN DE ROTAVIRUS Y FRECUENTEMENTE SE ACUMULA AL CONCLUIR LA REPLICACIÓN VIRAL

En nuestro trabajo determinamos la cinética de expresión y distribución de la proteína NSP1 de rotavirus. Trabajos previos habían abordado la cuestión limitándose a un solo tiempo post-infección [28, 50, 56, 99], por lo que estudiar la cinética de expresión y distribución de la proteína podría proporcionar datos que contribuyeran a conocer aspectos relacionados con la función de NSP1 a lo largo de la infección con rotavirus.

Para discutir los resultados obtenidos del análisis de la cinética de expresión de NSP1 es necesario describir la cinética de replicación de rotavirus (Fig. 8). Se ha descrito que la cinética de la replicación del genoma viral se caracteriza por tres fases, la primera, que denominamos como fase temprana, comprende hasta las 4 hpi aproximadamente y se caracteriza por un incremento lineal en la replicación del genoma viral; la segunda fase, que denominamos logarítmica, se caracteriza por un incremento logarítmico en la replicación del genoma y la

producción de progenie infecciosa; y finalmente ocurre la fase de meseta, aproximadamente a las 12 hpi, en la que tiene lugar un estancamiento de la replicación del genoma [51, 92]. La fase temprana posiblemente corresponde a lo que ocurre como consecuencia de la transcripción “primaria” de las partículas virales infectantes, mientras que la fase logarítmica parece requerir de la transcripción “secundaria” derivada de partículas virales formadas *de novo* en los viroplasmos [51]. Por otro lado, la cinética de replicación del genoma de rotavirus correlaciona con la cinética de producción de progenie viral infecciosa [51].

El análisis de la cinética de expresión de NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV muestra que la proteína posee baja expresión durante la fase logarítmica de la replicación viral, que se incrementa durante la fase de meseta en una fracción de las células infectadas (Fig. 21 y Fig. 22).

Estos resultados muestran que durante la fase logarítmica de la replicación viral la proteína NSP1 mantiene un bajo nivel de expresión. Resultados previos en el laboratorio realizados por la M. en C. Piña-Vázquez [58] indican que, a pesar de que la síntesis de NSP1 recombinante (rNSP1) es robusta, la cantidad de proteína es baja, como resultado de su rápida degradación por vía del proteasoma, puesto que al tratar con inhibidores del proteasoma la cantidad de rNSP1 se incrementa hasta 4 veces. Sin embargo, componentes virales pueden estabilizar a rNSP1 si se transfectan células que expresan a esta proteína con el conjunto de los 11 mRNAs virales, incrementándose hasta en 7 veces la cantidad de rNSP1. Proponemos que la acumulación de NSP1 en la fase de meseta de la replicación de rotavirus se debe a la acumulación de

componentes virales (mRNA y proteínas virales) que interaccionan con NSP1 y la estabilizan, previniendo su degradación por el proteasoma.

NSP1 SE DISTRIBUYE EN FORMA PUNTEADA O EN CÚMULOS EN LA REGIÓN PERINUCLEAR DE CÉLULAS INFECTADAS CON ROTAVIRUS

Nuestros resultados sobre la distribución intracelular de la proteína NSP1 en células MA-104 infectadas con el rotavirus RRV muestran que una de las características más constantes es la distribución preferentemente perinuclear de NSP1. Asimismo encontramos que la distribución de NSP1 puede tomar 2 morfologías distintas: distribución punteada o distribución en cúmulos, ambos con bordes poco definidos. Los cúmulos no colocalizan con los viroplasmos.

Resulta pertinente mencionar que en la región perinuclear se acumulan componentes virales, ya que la adquisición de la tercera capa protéica de los rotavirus ocurre por gemación hacia el retículo endoplásmico [4], y los viroplasmos migran hacia la región perinuclear de la célula al avanzar la infección [100]. Esto podría relacionar la distribución perinuclear de la proteína NSP1 con la localización predominante de componentes virales en la región perinuclear de la célula, en particular con el retículo endoplásmico.

Otra explicación para el patrón de distribución de NSP1 sería que existiera alguna interacción entre esta proteína y componentes celulares. Se ha sugerido que podría existir una interacción débil o transitoria con algún componente del citoesqueleto, en particular con vimentina [28]. Aunque nuestros resultados son congruentes con la hipótesis de que factores virales son responsables de la acumulación de NSP1 en la región perinuclear, no podemos descartar que componentes celulares (como el citoesqueleto, con cuya fracción co-purifica

NSP1 en experimentos de fraccionamiento celular [28]), pudieran ser responsables de la ubicación intracelular de esta proteína.

Debido a que NSP1 se une específicamente a mRNAs virales, su acumulación al concluir la replicación viral podría deberse al exceso de mRNAs virales en el citosol durante la fase de meseta de la replicación. Probablemente NSP1 se une a los mRNA virales formando los cúmulos heterogéneos que caracterizan a esta fase.

NSP1 RECOMBINANTE SE DISTRIBUYE EN EL CITOPLASMA Y NO SOLAMENTE EN LA REGIÓN PERINUCLEAR

Estudiando la distribución de la proteína rNSP1, expresada en células BSC-1 mediante el sistema de vaccinia recombinante, encontramos que existen diferencias entre la distribución de ésta y la distribución de NSP1 dentro del contexto de la infección viral. La proteína rNSP1 se expresa en mayor nivel que NSP1 en células infectadas y además se distribuye de manera homogénea en el citoplasma, lo que sugiere que la distribución perinuclear característica de NSP1 en células infectadas podría estar determinada por su interacción con componentes virales. Asimismo, rNSP1 forma cúmulos que, en general, son más grandes que los producidos en células infectadas con rotavirus. La diversidad en tamaño de los puntos, cúmulos, pequeños y grandes donde se localiza NSP1 y la característica común a estos puntos y cúmulos de tener bordes irregulares o poco definidos sugiere que se trata de una misma morfología que sólo se diferencia por su tamaño, y probablemente es dependiente de la abundancia de la proteína.

FORMACIÓN DE VIROPLASMAS ALTERADOS EN CÉLULAS QUE SOBREENPRESAN NSP1

Dada la importancia de los viroplasmos para el ciclo replicativo de rotavirus, alteraciones en la morfología de dichas estructuras podrían indicar defectos en la replicación viral. Proponemos que los viroplasmos alterados que se forman en células que sobreexpresan NSP1 a tiempos tardíos post-infección se deben a la interacción entre viroplasmos y cúmulos de NSP1, explicando así el que los viroplasmos, que normalmente tienen morfología esférica regular, adopten formas irregulares.

De especial interés resultan nuestras observaciones sobre los cambios que ocurren en la expresión y distribución de NSP1 durante la fase de meseta del ciclo replicativo viral. En nuestro estudio, encontramos que, a partir de las 12 hpi, ocurre un incremento en el nivel de expresión de NSP1 en una fracción que puede representar hasta el 40% de las células infectadas y que dicho incremento suele ir acompañado de la formación de cúmulos de la proteína. Estos cambios ocurren durante la fase de meseta del ciclo replicativo de rotavirus, donde los modelos existentes, elaborados utilizando cultivos celulares infectados con rotavirus, sugieren que ya se han llevado a cabo los eventos más importantes de la replicación viral [51, 92].

Al respecto, encontramos que un alto nivel de expresión de NSP1 correlaciona con una distribución alterada de las proteínas de viroplasmos VP6 y NSP2 (Fig. 24). Los viroplasmos son estructuras esféricas y citoplásmicas que aparecen desde tiempos tempranos post-infección y son los sitios donde ocurre la replicación del genoma viral así como las fases iniciales de la morfogénesis de las partículas de la progenie [4]. Se ha reportado que las proteínas NSP2 y NSP5, que también se localizan en viroplasmos, son esenciales para la

formación de dichas estructuras así como para la síntesis de dsRNA y la replicación viral [38].

ALTAS MULTIPLICIDADES DE INFECCIÓN INCREMENTAN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE NSP1

Decidimos evaluar el efecto de la multiplicidad de infección y la sincronización de la infección sobre la expresión de NSP1, puesto que resultados obtenidos en el laboratorio muestran que ambos son factores que pueden alterar la distribución de proteínas virales [95]. Nuestros resultados sugieren que la fracción de células con alta expresión de NSP1 se incrementa de manera proporcional a la multiplicidad de infección, esto es, al número de partículas infecciosas por célula.

Se ha observado que infecciones virales a multiplicidades de infección elevadas propician la generación de partículas defectivas interferentes (partículas DI, del inglés *defective interfering*). La mayoría de estas partículas DI carecen de alguna porción del genoma viral del que derivan y por sí mismas no son infecciosas o sólo producen infecciones abortivas (en las que el virus infecta a la célula mas no se completa el ciclo de replicación) [101]. El virus silvestre puede actuar como un virus ayudante de forma que en células coinfectadas con un virus DI y virus silvestre, el virus DI puede replicarse y producir partículas DI como progenie, interfiriendo con la replicación del virus silvestre. Al infectar células con RRV a multiplicidades de infección crecientes se estaría incrementando el número de partículas infecciosas que infectan una misma célula, por lo tanto también se estaría incrementando la probabilidad de coinfección por una partícula DI y una partícula viral silvestre. Puesto que la

producción de partículas DI suele conducir a defectos en la replicación, el incremento que observamos en la expresión de NSP1 podría ser reflejo de replicación defectiva en dichas células.

Una explicación alternativa es que a altas MOIs la transcripción primaria se incrementa por las partículas infectantes. Una transcripción primaria robusta podría resultar en la exposición de NSP1 a componentes virales que la estabilizan, incrementando la frecuencia de células con altos niveles de NSP1 en la fase terminal o de meseta de la replicación.

En cambio, respecto a la sincronización de la infección nuestros resultados indican que en infecciones sincronizadas se incrementa la expresión de NSP1. Podríamos considerar que en infecciones no-sincronizadas un mayor número de partículas virales infectan una determinada célula, debido a las infecciones extemporáneas, en comparación con las infecciones sincronizadas en las que se evita la ocurrencia de infecciones extemporáneas al utilizar el anticuerpo neutralizante 4F8. Con esta hipótesis, se esperaría que en infecciones no-sincronizadas se incremente la expresión de NSP1, lo que no concuerda con nuestros resultados. Sin embargo nuestros resultados podrían explicarse proponiendo que existe un programa de expresión para NSP1 que incluye el que el nivel de la proteína se incremente durante la fase de meseta del ciclo replicativo y que las infecciones extemporáneas estarían representando un factor que modifica el programa de expresión de NSP1 funcionando como un elemento que regresa dicho programa al característico de las fases tempranas de la infección viral donde la expresión de NSP1 es baja. Aunque en este estudio no logramos identificar con precisión la razón de que las condiciones de infección, en cuanto a MOI y sincronización, afecten el nivel de expresión de

NSP1, interesantemente sugerimos que parece ocurrir un “programa de expresión” que puede ser alterado de acuerdo a las condiciones de infección. Se requieren estudios adicionales para determinar si esta hipótesis es correcta o no.

FACTORES VIRALES PODRÍAN AFECTAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE NSP1

Resultados obtenidos por Vallejo-Espí [95] sugieren que la distribución de VP2 podría fungir como marcador de replicación defectiva en células BSC-1 infectadas con la cepa de rotavirus SA11. De acuerdo con lo reportado por Vallejo-Espí, la proteína VP2 posee una distribución caracterizada como “difusa más agregados”, pero en condiciones que sugieren defectos en la replicación viral VP2 tiene una distribución “sólo difusa”. Buscando utilizar la distribución de la proteína VP2 como marcador de replicación defectiva analizamos el comportamiento de esta proteína en nuestro sistema de células MA-104 infectadas con RRV. Encontramos que la proteína VP2 de RRV no funciona como marcador de replicación defectiva, puesto que no es posible detectar la distribución “sólo difusa” en infecciones con RRV. Puesto que tampoco se observa la distribución “sólo difusa” de VP2 en células BSC-1 infectadas con RRV, mientras que sí se observó dicho fenotipo en células BSC-1 infectadas con SA11, tal como reportó Vallejo-Espí [95], pareciera que este fenotipo depende de la cepa viral y no de la línea celular.

Se decidió investigar si existía relación entre la distribución alterada de proteínas virales y la inducción de apoptosis, ya que se ha reportado que ocurre apoptosis en células MA-104 infectadas con rotavirus luego de las 12 hpi [87]. Probamos a utilizar la degradación de lamina como marcador de

apoptosis, puesto que se ha reportado que ocurre esta degradación en células KE37 de humano en las cuales se ha inducido apoptosis. Nuestros resultados muestran que la degradación de lamina no funciona como marcador de apoptosis en las células MA-104. Sin embargo, no descartamos que pudiera existir relación entre la inducción de apoptosis y la distribución alterada de proteínas virales, pero para investigarlo sería necesario utilizar otros marcadores de apoptosis, tales como la translocación de fosfatidilserina a la membrana externa celular, o la activación de caspasas efectoras.

Trabajos previos realizados en el laboratorio estudiaron el efecto de componentes virales sobre la estabilidad de NSP1 [58]. Dichos estudios muestran que la proteína NSP1 recombinante, expresada en células BSC-1 mediante el sistema del virus vaccinia, es susceptible a degradación por el proteasoma. Asimismo, muestran que la transfección con mRNA total de rotavirus incrementa la expresión de NSP1 recombinante y revierte su susceptibilidad a degradación por el proteasoma. Además, dichos resultados indican que el mRNA debe ser traducido para incrementar el nivel de NSP1 recombinante, implicando que son proteínas virales, solas o en combinación con el mRNA, las responsables del incremento en la expresión de NSP1 recombinante [58]. Con estos antecedentes, en este trabajo exploramos parcialmente el efecto del proteasoma y del mRNA sobre la expresión de NSP1 dentro del contexto de la infección viral.

Para investigar el efecto del proteasoma sobre la expresión de NSP1 utilizamos las drogas CLL (clasto-lactacistina- β -lactona) y MG132 que funcionan como inhibidores del proteasoma. Los resultados que obtuvimos sugieren que en células infectadas con RRV el proteasoma no afecta la expresión de NSP1

(Fig. 33 y Fig. 34). En estudios previos realizados mediante marcaje metabólico de la proteína rNSP1 se encontró que el nivel de la proteína en presencia de CLL se incrementó hasta 4 veces [58], mientras que en este estudio no encontramos efecto sobre el nivel de expresión de NSP1 bajo las condiciones exploradas. Esta diferencia podría deberse a que en este caso se tiene a la proteína en el contexto de la infección viral, donde se encuentra en contacto con otros factores que también podrían estar regulando su nivel de expresión, tales como proteínas y mRNA virales, volviendo a la proteína menos sensible a degradación por el proteasoma. Nuestros resultados invalidan nuestra hipótesis de que el incremento en la expresión de NSP1 durante la fase de meseta de la replicación viral podría estar mediado por una menor susceptibilidad de la proteína a ser degradada por el proteasoma, responsable de la tendencia de NSP1 a formar cúmulos.

Nuestros resultados sobre el efecto del mRNA viral sobre la expresión y distribución de NSP1 sugieren que el mRNA_{RRV} no modifica la distribución intracelular de la proteína. Sin embargo, sugieren que bajo ciertas condiciones el mRNA_{RRV} podría incrementar la expresión de NSP1 en células infectadas con RRV (Fig. 37). Para el caso de la proteína rNSP1, el efecto estabilizador del mRNA_{RRV} reportado está dado por proteínas virales, solas o en combinación con el mRNA_{RRV} [58]. En este caso, puesto que se está evaluando el efecto del mRNA_{RRV} sobre NSP1 dentro del contexto de la infección viral existe una gran cantidad de proteínas virales que pudieran estar mediando el efecto observado, por lo que se requieren otros experimentos para determinar si nuestros resultados se deben sólo a la interacción de NSP1 con el mRNA_{RRV} o si están involucradas otras proteínas virales. Los resultados obtenidos

mediante Western-blot (Fig. 38) muestran que, bajo las condiciones experimentales ensayadas, la transfección de mRNA_{RRV} no afecta la expresión de NSP1; pero consideramos que sería conveniente explorar distintas condiciones experimentales puesto que factores tales como la MOI o la concentración y calidad del mRNA_{RRV} transfectado pudieran influir sobre el resultado.

En conjunto con los estudios previos realizados sobre el efecto del proteasoma y de la transfección de mRNA_{RRV} sobre la expresión de rNSP1 [58], nuestros resultados, aunque parciales, son congruentes con la hipótesis de que componentes virales estabilizan a la proteína NSP1. Además, sugieren que, en el contexto de la infección viral y bajo ciertas condiciones, factores como la transfección de mRNA_{RRV} podrían tener un efecto sobre la expresión de NSP1. Proponemos que la acumulación de componentes virales durante la fase de meseta de la replicación viral es la responsable de la acumulación de NSP1 observada a dichos tiempos. La unión de NSP1 a componentes virales la estabilizaría, ya que esta interacción evitaría la auto-ubiquitinación de NSP1 y por tanto su degradación.

CONCLUSIONES

Encontramos que NSP1 en células MA-104 infectadas con RRV:

- se distribuye de manera difusa en el citoplasma, preferentemente en la región perinuclear y con un patrón punteado
- tiene un bajo nivel de expresión durante la fase de replicación de la infección viral, que se incrementa durante la fase de meseta
- puede formar cúmulos a partir de la fase de meseta de la infección viral
- incrementa su nivel de expresión de manera proporcional a la multiplicidad de infección

La proteína NSP1 recombinante expresada en células BSC-1 mediante el sistema del virus vaccinia recombinante:

- se distribuye de forma difusa y homogénea en el citoplasma frecuentemente formando cúmulos, lo que sugiere que el patrón punteado y perinuclear característico de NSP1 en el contexto de la infección viral podría estar determinado por factores virales

PERSPECTIVAS

- Investigar la existencia de un posible “programa de expresión de genes” en el ciclo replicativo de rotavirus.
- Determinar la función de la interacción entre NSP1 y el extremo 5' de los mRNAs virales en la infección por rotavirus.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

Acetato de sodio (0.2 M) (100 mL). Disolver 1.64 gr acetato de sodio en 100 mL agua destilada estéril.

Ácido acético (0.2 M) (100 mL). Mezclar 98.8 mL de agua destilada estéril y 1.2 mL ácido acético glacial.

Acrilamida-bis-acrilamida (30:0.8) (50 mL). Disolver en 50 mL de agua destilada estéril tibia 15 gr de acrilamida y 0.4 gr de bis-acrilamida. Almacenar a 4 °C.

APS (10%). Disolver 0.1 gr de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada estéril. Almacenar a 4 °C protegido de la luz.

Buffer de acetatos (0.05 M) pH 5 (100 mL). Mezclar 75 mL de agua destilada estéril, 17.8 mL acetato de sodio (0.2 M) y 7.2 mL ácido acético (0.2 M). Ajustar pH a 5.

Buffer de corrida (10X) (500 mL). Disolver en 450 mL de agua destilada estéril 72 gr glicina y 15 gr Tris.

Buffer de corrida (1X) (1 L). Mezclar 895 mL de agua destilada, 100 mL buffer de corrida (10X) y 10 mL SDS (10%).

Buffer de digestión (400 μ L). Mezclar 357.9 μ L de agua destilada, 20 μ L Tris-HCl (1 M) pH=7.4, 2 μ L $MgCl_2$ (1 M), 2.7 μ L DNasa (100U/ μ L), 0.4 μ L RNasa (100 mg/mL) y 15 μ L 8340 Cocktail (Sigma-Aldrich®, # Cat. P8340).

Buffer de Muestra (2X) (100 mL). Mezclar en 40 mL de agua destilada estéril 25 mL 4X Tris-HCl/SDS pH=6.8, 20 mL glicerol, 4 gr SDS, 2 mL de beta-mercaptoetanol y 1 mg azul de bromofenol. Aforar a 100 mL con agua destilada estéril. Hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -70 °C.

Buffer de Transferencia (1 L). Disolver en 600 mL de agua destilada estéril 3 gr Tris, 14.4 gr glicina, 10 mL SDS (10%) y 150 mL MeOH. Aforar a 1 L con agua destilada estéril.

DAPI-stock. Disolver 20 mg de DAPI (Sigma-Aldrich®, # Cat. D9542) en agua destilada estéril. Almacenar a 4 °C en oscuridad.

EDTA (0.5 M) pH 8 (50 mL). Disolver 9.31 gr $EDTA \cdot 2Na \cdot 2H_2O$ en 30 mL agua destilada. Ajustar pH a 8 con NaOH para disolver. Esterilizar en autoclave.

EDTA (100 mM) pH 7.2 (50 mL). Disolver 1.86 gr de $EDTA \cdot 2Na \cdot 2H_2O$ en 25 mL agua destilada. Ajustar pH a 7.2 para que se disuelva. Aforar a 50 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Gel de poliacrilamida al 12%. Separador (10 mL): mezclar 4.3 mL agua destilada, 2.5 mL Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 3 mL acrilamida:bis-acrilamida (30:0.8), 100 μ L SDS 10%, 100 μ L APS 10% y 10 mL TEMED. Concentrador (5 mL): mezclar 3.2 mL agua destilada, 1.25 mL Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), 0.5 mL acrilamida:bis-acrilamida (30:0.8), 50 μ L SDS 10%, 50 μ L APS 10% y 10 mL TEMED

HCl (1 N) (100 mL). Mezclar 8.62 mL HCl concentrado y 91.38 mL de agua destilada estéril.

IPTG-stock (100 mM) (1 mL). Disolver 28.3 mg de IPTG (Research Organics, # Cat. 70571) en 10 mL de agua milliQ estéril.

MEM (Minimum Essential Medium). Mezclar 100 mL de MEM (Gibco™, # Cat. 11700-077), 3 mL de NaHCO₃ 7.5%, 1 mL de Glutamax 100X (Gibco™, # Cat. 35050), 1 mL de Penicilina-Estreptomicina 100X (Gibco™, # Cat. 15140) y 1 mL de HEPES 1M. Para preparar MEM 2.5, MEM-7 y MEM-10 se adicionan 2.5, 7 o 10 mL de Suero Fetal Bovino (Gibco™, # Cat. 16000), respectivamente. Almacenar a 4 °C.

MgCl₂ (1 M) (50 mL). Disolver 10.15 gr de MgCl₂ en agua destilada. Aforar a 50 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Paraformaldehído 4% (100 mL). Calentar 50 mL de agua destilada a 60 °C y añadir 4 gr de Paraformaldehído (Sigma-Aldrich®, # Cat. 158127-100G). Añadir

1 gota de NaOH (2N). Añadir 33.3 mL de PBS (3X). Ajustar pH a 7.2 con HCl (1 N). Aforar hasta 100 mL con agua destilada estéril. Esterilizar por filtración con filtro de 0.25 μ de diámetro de poro. Hacer alícuotas de 5 mL y almacenar a -20 °C.

PBS (1X) (1 L). A 800 mL de agua destilada estéril agregar 100 mL PBS A (10X), 10 mL PBS B (10 X) y 10 mL PBS C (10X). Aforar a 1 L con agua destilada estéril.

PBS (3X) (115 mL). Mezclar 100 mL de Solución 1-PBS (3X) y 15 mL de Solución 2-PBS (3X). Ajustar el pH a 7.2 y esterilizar en autoclave.

PBS A (10X) (500 mL). Disolver en 300 mL de agua destilada: 40 gr NaCl, 1 gr KCl, 7.2 gr Na₂HPO₄, 1.2 gr KH₂PO₄. Ajustar pH a 7.4. Esterilizar en autoclave.

PBS A (1X) (500 mL). A 450 mL de agua destilada estéril adicionar 50 mL de PBS A (10X).

PBS B (10X) (100 mL). Disolver 1.gr MgCl₂ en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

PBS C (10 X) (100 mL). Disolver 1 gr CaCl₂ en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

PBST (0.1%) (50 mL). A 50 mL PBS (1X) adicionar 50 μ L Triton® X-100 (Sigma-Aldrich®, # Cat. X100-100ML).

PBST-BSA (1%) (50 mL). Disolver 0.5 gr BSA (Research Organics, # Cat. 1338A) en 50 mL PBST.

Rojo de Fenol al 1%. Mezclar 1 gr de rojo de fenol con 0.2 mL NaOH 1N. Aforar a 10 mL con agua destilada. Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 μ de diámetro de poro.

SDS (10%) (100 mL). Disolver 10 gr SDS en 80 mL de agua destilada estéril.

Solución 1-PBS (3X) (100 mL). Disolver 390 gr NaCl y 30 gr NaH_2PO_4 en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Solución 1-PBS (3X) (100 mL). Disolver 390 gr NaCl y 30 gr Na_2HPO_4 en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Solución Activadora (10 mL). Adicionar 100 μ L de tripsina (2 mg/mL) a 10 mL de MEM-S/S para una concentración final de tripsina de 20 μ g/mL.

Solución de Stripping (10 mL). Mezclar 6.93 mL de agua destilada estéril, 1 mL Tris-HCl (1 M) pH 7.5, 2 mL SDS (10%) y 70 μ L 2- β -mercaptoetanol.

Solución Sustrato (8.6 mL). En un tubo de polipropileno de 15 mL mezclar 6.75 mL de buffer de acetatos pH 5 (0.05 M), 1.5 mL amino-etil carbamazol (4 mg/mL) y 37.5 μ L H₂O₂. Filtrar con membrana de 0.25 μ de diámetro de poro.

Suero α -rotavirus (R α R) (1:500) (8 mL). En un tubo de polipropileno de 15 mL mezclar 7.984 mL de PBS A (1X) y 16 μ L Suero R α R 1-5 999.

TBS (Tris-buffered saline) pH 7.4 (1 L). Disolver 100 mL Tris (1 M) pH=7.5, 8 gr NaCl y 0.2 gr KCl en 900 mL agua milliQ.

Tripsina (2 mg/mL) (50 mL). Disolver 100 mg tripsina 1:250 (Sigma-Aldrich®, # Cat. T-4799) en 49.9 mL MEM-S/S sin antibiótico. Esterilizar por filtración con membrana de 0.1 μ de diámetro de poro. Hacer alícuotas de 500 μ L y almacenar a -20 °C.

Tripsina 0.25% (50 mL). En un frasco de cultivo disolver 12.5 mg de tripsina 1:250 (Sigma-Aldrich®, # Cat. T-4799) en 49.9 mL MEM-S/S sin antibiótico 12.5 mg de tripsina 1:250 (Sigma-Aldrich®, # Cat. T-4799). Esterilizar por filtración con filtro de 0.1 μ de diámetro de poro. Hacer alícuotas de 500 μ L y almacenar a -20 °C.

Tripsina-EDTA para cultivo de células (1 L). En 1000 mL de PBS A (1X) estéril, recién preparado, mezclar 220 mg EDTA•4Na•2H₂O, 1.6 mL rojo de fenol al 1% y 500 mg tripsina 1:250 (Sigma-Aldrich®, # Cat. T-4799). Filtrar con

filtro Millipore™ de 0.2 μ de diámetro de poro. Preparar alícuotas de 50 mL. Almacenar a -20 °C.

Tris-HCl (0.5 M) pH 6.8 (100 mL). Disolver 6.06 gr Tris en 40 mL agua destilada. Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl (1 M) pH 7.4 (100 mL). Disolver 12.11 gr Tris en 50 mL agua destilada. Ajustar pH a 7.4 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl (1 M) pH 7.5 (1 L). Disolver 122.10 gr Tris en 500 mL agua destilada. Ajustar pH a 7.5 con HCl concentrado. Aforar a 1 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl (1.5M) pH 8.8 (150 mL). Disolver 27.6 gr Tris en 70 mL de agua destilada. Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 150 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

TTBS (0.15%) (1 L). Disolver 1.5 mL de Tween®20 (Sigma-Aldrich®, # Cat. P9416) en 1000 mL TBS (1X).

TTBS-1% leche (100 mL). Disolver 1 gr de leche Svelty sin grasa (Nestlé®) en 100 mL TTBS (0.15%).

TTBS-5% leche (50 mL). Disolver 2.5 gr de leche Svelty sin grasa (Nestlé®) en 50 mL TTBS (0.15%).

Verseno (1:3000) (1 L). Disolver 0.32 gr EDTA•2H₂O en 1000 mL PBS A (1X).
Verificar que el pH 7.5. Esterilizar en autoclave.

REFERENCIAS

1. *Rotavirus surveillance--worldwide, 2001-2008*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008. **57**(46): p. 1255-7.
2. Flewett, T.H.B., A.S.; Davies, H.; Woode, G.N.; Bridger, J.C.; Derrick, J.M., *Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves*. Lancet, 1974. **2**(7872): p. 61-3.
3. Nakata, S., et al., *Antigenic characterization and ELISA detection of adult diarrhea rotaviruses*. J Infect Dis, 1986. **154**(3): p. 448-55.
4. Estes, M.K., *Rotaviruses and their Replication*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe, Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.E., Martin, M.A., Roizman, B., Strauss, S.E., Editor. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Pa. p. 1747-1786.
5. Matthijnssens, J., et al., *Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments*. Arch Virol, 2008. **153**(8): p. 1621-9.
6. Prasad, B.V., et al., *Three-dimensional structure of rotavirus*. J Mol Biol, 1988. **199**(2): p. 269-75.
7. Patton, J.T. and C.O. Gallegos, *Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle*. J Gen Virol, 1990. **71** (Pt 5): p. 1087-94.
8. Lawton, J.A., et al., *Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7353-60.
9. Prasad, B.V., et al., *Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 471-3.
10. Yeager, M., et al., *Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction*. J Cell Biol, 1990. **110**(6): p. 2133-44.

11. Yeager, M., et al., *Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis*. EMBO J, 1994. **13**(5): p. 1011-8.
12. Lawton, J.A., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(2): p. 118-21.
13. Sandino, A.M., et al., *Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription*. J Virol, 1986. **60**(2): p. 797-802.
14. Liu, M., N.M. Mattion, and M.K. Estes, *Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity*. Virology, 1992. **188**(1): p. 77-84.
15. Pizarro, J.L., et al., *Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 2)**: p. 325-32.
16. Valenzuela, S., et al., *Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3964-7.
17. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. Virus Res, 2004. **101**(1): p. 67-81.
18. Chizhikov, V. and J.T. Patton, *A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus*. RNA, 2000. **6**(6): p. 814-25.
19. Imai, M., et al., *Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments*. J Virol, 1983. **47**(1): p. 125-36.
20. McCrae, M.A. and J.G. McCorquodale, *Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species*. Virology, 1983. **126**(1): p. 204-12.
21. Patton, J.T., et al., *Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9618-26.

22. Zeng, C.Q., et al., *Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 2736-42.
23. Patton, J.T., *Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7940-7.
24. Labbe, M., et al., *Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein*. J Gen Virol, 1994. **75 (Pt 12)**: p. 3423-30.
25. Zeng, C.Q., et al., *The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 201-8.
26. Chen, D., et al., *Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase*. Virology, 1999. **265**(1): p. 120-30.
27. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
28. Hua, J., X. Chen, and J.T. Patton, *Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3990-4000.
29. Dunn, S.J., T.L. Cross, and H.B. Greenberg, *Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization*. Virology, 1994. **203**(1): p. 178-83.
30. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4114-9.
31. Graff, J.W., K. Ettayebi, and M.E. Hardy, *Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism*. PLoS Pathog, 2009. **5**(1): p. e1000280.
32. Deo, R.C., et al., *Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer*. Cell, 2002. **108**(1): p. 71-81.

33. Poncet, D., S. Laurent, and J. Cohen, *Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3*. EMBO J, 1994. **13**(17): p. 4165-73.
34. Groft, C.M. and S.K. Burley, *Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1273-83.
35. Piron, M., et al., *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5811-21.
36. Mattion, N.M., et al., *Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34*. Virology, 1992. **190**(1): p. 68-83.
37. Aponte, C., D. Poncet, and J. Cohen, *Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 985-91.
38. Fabbretti, E., et al., *Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 2): p. 333-9.
39. Taraporewala, Z., D. Chen, and J.T. Patton, *Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 9934-43.
40. Taraporewala, Z.F. and J.T. Patton, *Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4519-27.
41. Jiang, X., et al., *Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10829-35.
42. Taraporewala, Z.F., et al., *Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7984-94.
43. Mattion, N.M., et al., *Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11*. Virology, 1991. **181**(1): p. 295-304.

44. Torres-Vega, M.A., et al., *The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 3): p. 821-30.
45. Ball, J.M., et al., *Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein*. Science, 1996. **272**(5258): p. 101-4.
46. Taylor, J.A., et al., *The RER-localized rotavirus intracellular receptor: a truncated purified soluble form is multivalent and binds virus particles*. Virology, 1993. **194**(2): p. 807-14.
47. Morris, A.P., et al., *NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G431-44.
48. Greenberg, H.B. and M.K. Estes, *Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination*. Gastroenterology, 2009. **136**(6): p. 1939-51.
49. Arias, C.F., et al., *Molecular biology of rotavirus cell entry*. Arch Med Res, 2002. **33**(4): p. 356-61.
50. Silvestri, L.S., Z.F. Taraporewala, and J.T. Patton, *Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm*s. J Virol, 2004. **78**(14): p. 7763-74.
51. Ayala-Breton, C., et al., *Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference*. J Virol, 2009. **83**(17): p. 8819-31.
52. Lu, X., et al., *Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1*. Structure, 2008. **16**(11): p. 1678-88.
53. John B. Carter, V.A.S., *Virology: Principles and Applications*. 2007: John Wiley & Sons, Ltd.
54. Mitchell, D.B. and G.W. Both, *Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53*. Virology, 1990. **174**(2): p. 618-21.
55. Xu, L., et al., *Molecular biology of rotaviruses. IX. Conservation and divergence in genome segment 5*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 12): p. 3413-21.

56. Hua, J. and J.T. Patton, *The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication*. *Virology*, 1994. **198**(2): p. 567-76.
57. Ericson, B.L., et al., *Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells*. *J Virol*, 1982. **42**(3): p. 825-39.
58. Pina-Vazquez, C., et al., *Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells*. *Arch Virol*, 2007. **152**(2): p. 345-68.
59. Taniguchi, K., K. Kojima, and S. Urasawa, *Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153-155*. *J Virol*, 1996. **70**(6): p. 4125-30.
60. Tian, Y., et al., *Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance*. *J Virol*, 1993. **67**(11): p. 6625-32.
61. Haller, O., G. Kochs, and F. Weber, *The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses*. *Virology*, 2006. **344**(1): p. 119-30.
62. Graff, J.W., et al., *Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1*. *J Virol*, 2002. **76**(18): p. 9545-50.
63. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7*. *J Virol*, 2007. **81**(9): p. 4473-81.
64. Broome, R.L., et al., *Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence*. *J Virol*, 1993. **67**(5): p. 2448-55.
65. Holloway, G., T.T. Truong, and B.S. Coulson, *Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB*. *J Virol*, 2009. **83**(10): p. 4942-51.
66. Arnold, M.M. and J.T. Patton, *Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains*. *J Virol*. **85**(5): p. 1970-9.

67. Graff, J.W., et al., *Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 613-20.
68. Sen, A., et al., *IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10322-35.
69. Bagchi, P., et al., *Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection*. J Virol, 2010. **84**(13): p. 6834-45.
70. Fenaux, M., et al., *Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5219-32.
71. Feng, N., et al., *Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts*. J Virol, 2009. **83**(14): p. 6987-94.
72. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
73. Vaux, D.L., *Caspases and apoptosis - biology and terminology*. Cell Death Differ, 1999. **6**(6): p. 493-4.
74. Hofman, P. and P. Auberger, *[Roles and mechanisms of apoptosis in infectious diseases]*. Ann Pathol, 2000. **20**(4): p. 313-22.
75. Roulston, A., R.C. Marcellus, and P.E. Branton, *Viruses and apoptosis*. Annu Rev Microbiol, 1999. **53**: p. 577-628.
76. Duprez, L., et al., *Major cell death pathways at a glance*. Microbes Infect, 2009. **11**(13): p. 1050-62.
77. Hay, S. and G. Kannourakis, *A time to kill: viral manipulation of the cell death program*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 7): p. 1547-64.
78. Burns, J.W., et al., *Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model*. Virology, 1995. **207**(1): p. 143-53.
79. Little, L.M. and J.A. Shaddock, *Pathogenesis of rotavirus infection in mice*. Infect Immun, 1982. **38**(2): p. 755-63.

80. Snodgrass, D.R., et al., *Small intestinal morphology and epithelial cell kinetics in lamb rotavirus infections*. Gastroenterology, 1979. **76**(3): p. 477-81.
81. Berkova, Z., et al., *Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm*s. J Virol, 2006. **80**(12): p. 6061-71.
82. Seo, N.S., et al., *Inaugural article: integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8811-8.
83. Shaw, R.D., S.J. Hempson, and E.R. Mackow, *Rotavirus diarrhea is caused by nonreplicating viral particles*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 5946-50.
84. Boshuizen, J.A., et al., *Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13005-16.
85. Superti, F., et al., *Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus*. J Med Virol, 1996. **50**(4): p. 325-34.
86. Chaibi, C., et al., *Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells*. Virology, 2005. **332**(2): p. 480-90.
87. Martin-Latil, S., et al., *Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4457-64.
88. Cooray, S., *The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 5): p. 1065-76.
89. Ehrhardt, C. and S. Ludwig, *A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway*. Cell Microbiol, 2009. **11**(6): p. 863-71.
90. Moss, B. and C. Flexner, *Vaccinia virus expression vectors*. Annu Rev Immunol, 1987. **5**: p. 305-24.
91. Elroy-Stein, O., Moss, B., *Gene Expression Using the Vaccinia Virus/T7 RNA Polymerase Hybrid System*, in *Current Protocols in Molecular Biology*., F.M. Ausubel, Brent, R., Kingston R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Editor. 2007, John Wiley & Sons, Inc.
92. Johnson, M.A. and M.A. McCrae, *Molecular biology of rotaviruses. VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2048-55.

93. Perrault, J., *Origin and replication of defective interfering particles*. Curr Top Microbiol Immunol, 1981. **93**: p. 151-207.
94. Ruggeri, F.M. and H.B. Greenberg, *Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2211-9.
95. Vallejo-Espí, M.L., *Estudio de la distribución intracelular de la proteína VP2 de rotavirus*. 2010, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F.
96. Buendia, B., J.C. Courvalin, and P. Collas, *Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(12-13): p. 1781-9.
97. Acrani, G.O., et al., *Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression*. Virus Res. **149**(1): p. 56-63.
98. Contin, R., et al., *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins*. J Gen Virol. **91**(Pt 7): p. 1782-93.
99. Gonzalez, R.A., et al., *In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins*. Arch Virol, 1998. **143**(5): p. 981-96.
100. Rangel-Huerta, E., *Estudio de la formación y crecimiento de viroplasmias de rotavirus mediante la estabilización de microtúbulos*. 2011, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F.
101. Huang, A.S. and D. Baltimore, *Defective viral particles and viral disease processes*. Nature, 1970. **226**(5243): p. 325-7.