



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES NECESARIAS
EN LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS UTILIZANDO GENÓMICA
FUNCIONAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ING. DANIELA SILVA AYALA

TUTOR PRINCIPAL

CARLOS FEDERICO ARIAS ORTÍZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DRA. ALEJANDRA COVARRUBIAS ROBLES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DRA. ROSA MARIA DEL ANGEL

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2014.



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de el Dr. Carlos Federico Arias Ortíz. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por SEP-CONACYT ##153639; además de los donativos PAPIIT- DGAPA IN219208 y PAPIIT-DGAPA IG200114.

A mi mami.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Generalidades de rotavirus	3
Genoma	4
Estructura	6
Ciclo replicativo	11
Vías celulares implicadas en la entrada de rotavirus.....	19
Endocitosis y tráfico celular	19
Uniones estrechas	27
Estrategia experimental	29
RNA de interferencia	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Células y virus	35
Anticuerpos, plásmidos y reactivos	35
Western blot	36
Ensayos de infectividad por inmunofluorescencia	37
Determinación de rendimiento viral	38
Internalización de transferrina	38
Biblioteca de siRNAs	38
Lipofección reversa de siRNAs	39
Ensayos In Cell Western (ICW)	39
RT-PCR en tiempo real	39
Transfección de plásmidos	40
Tratamiento con el anticuerpo Anti-LBPA	40
Análisis de la entrada de rotavirus por microscopía confocal	41
Análisis de enriquecimiento	41
Análisis estadístico	41

RESULTADOS

Identificación de proteínas celulares importantes en el ciclo replicativo de rotavirus mediante RNAi	42
Clasificación de la función molecular y vías celulares implicadas de los genes definidos como importantes en la infección por rotavirus	45
Validación y caracterización de procesos biológicos necesarios en la infección por rotavirus	48
Vía de uniones estrechas	48
Vía de ubiquitinación-proteosoma	52
Vía de endocitosis.....	54
Papel del complejo ESCRT en la entrada de rotavirus	55
Componentes endosomales en la entrada de rotavirus	60
Cinética de entrada de rotavirus.....	64
DISCUSIÓN	70
REFERENCIAS	79

RESUMEN

Los rotavirus aprovechan la función de múltiples proteínas hospederas para su propio beneficio durante el proceso de infección. Con objetivo de caracterizar la interacción rotavirus-hospedero, realizamos un análisis global para identificar factores celulares requeridos en el ciclo replicativo de este virus. Utilizamos un ensayo a gran escala en el que evaluamos el efecto de una biblioteca de siRNAs dirigida contra aproximadamente 23,000 genes celulares. Identificamos 522 genes, cuyo silenciamiento por RNAi aumentó o disminuyó la expresión de proteínas virales en células infectadas con rotavirus. El análisis de los datos obtenidos demostró que las proteínas definidas como positivas se encuentran implicadas en un gran rango de funciones celulares, sugiriendo varias vías metabólicas que pudieran estar relacionadas en el ciclo replicativo de rotavirus. Las vías celulares más relevantes en este análisis fueron las vías ubiquitina-proteasoma, uniones estrechas y procesos de endocitosis. De particular interés fueron 15 proteínas celulares que participan en procesos de endocitosis y que pudieran participar en la entrada del virus, ya que, tras la inhibición de su síntesis, la infectividad del virus disminuyó. Dentro de este grupo de proteínas encontramos componentes pertenecientes a la recientemente descrita maquinaria de ESCRT. La importancia de esta maquinaria recae en la diversidad de procesos biológicos en los que participa, tales como citoquinesis, endocitosis y procesos de gemación viral. La inhibición de la expresión por siRNA de la síntesis de las proteínas HRS, TSG101, VPS37D, VPS27, VPS24, ALIX y VPS4A, pertenecientes al complejo ESCRT, generó una disminución en la infectividad de las cepas RRV y UK de rotavirus. Estos resultados fueron corroborados con el uso de dominantes negativas (DN) de las proteínas TSG101, ALIX y VPS4A. Como parte de la caracterización de la entrada del virus, decidimos evaluar la participación de componentes genéricos en procesos de tráfico celular. Encontramos que RAB5 y EEA1, componentes de los endosomas tempranos (EE), son necesarios en la infectividad de UK y RRV, mientras que las GTPasas RAB7 y RAB9, componentes de los endosomas tardíos (LE), son sólo necesarias en la infección por UK. Este resultado sugirió que las cepas UK y RRV utilizan diferentes vías de transporte vesicular durante su entrada a la célula hospedera. Cuantificamos también co-localización de partículas de UK y RRV con componentes de la vía endocítica, utilizando microscopía confocal. Logramos co-localizar en tiempos tempranos de la infección (10-60 min) a UK y RRV con componentes de ESCRT (HRS, TSG101 y VPS4A) y marcadores de EE (EEA1 y RAB5); sin embargo, únicamente la cepa de UK co-localizó con marcadores de tiempos tardíos (RAB7 y RAB9) en tiempos tempranos de la infección. Con este trabajo hemos demostrado la participación de la maquinaria ESCRT en los eventos tempranos de la infección por rotavirus, siendo el primer virus no-envuelto que se ha descrito utiliza la maquinaria ESCRT para su entrada a la célula. Conjuntamente, conseguimos caracterizar detalladamente el tráfico de las cepas UK y RRV de rotavirus en el espacio intracelular. Este trabajo demuestra la eficiencia de los análisis de RNAi a gran escala como herramientas de genética reversa para el estudio de la interacción virus y sus hospederos.

ABSTRACT

Rotavirus hijacks the function of multiple host proteins for their own benefit during viral infection. To have a detailed understanding of rotavirus-host cell interactions, we performed a high-throughput screening to identify host factors required for the virus' replicative cycle. We developed an assay in which the effect of a genome-wide siRNA library directed against approximately 23, 000 cellular genes was evaluated. By this approach we were able to recognize 522 cellular proteins that affect rotavirus strain RRV protein expression after cell infection. The positive hits' functional clustering outlined several cellular pathways, suggesting several metabolic pathways that might be involved in replication cycle of rotavirus. The most relevant cellular pathways found in the analysis were the ubiquitin-proteasome pathway, tight-junctions pathway, and endocytic processes. Of particular interest were 15 cellular proteins, which participate in endocytic processes that might orchestrate virus entry since, upon inhibition of their synthesis, the infectivity of the virus decreased. Among this group of proteins we found components of the recently described ESCRT machinery. The importance of this machinery lies on the variability of biological processes in which it participates, such as cytokinesis events, endocytosis and viral budding processes. Inhibition of the expression by siRNA of HRS, TSG101, VPS37D, VPS27, VPS24, ALIX and VPS4A proteins, components of the ESCRT complex, decreased the infectivity of RRV and UK rotavirus strains. These results were substantiated using DN versions of TSG101, ALIX, and VPS4A proteins. For the characterization rotavirus entry, we also evaluated the participation of generic components of cellular trafficking processes. We found that RAB5 and EEA1, components of early endosomes (EE), are necessary for UK and RRV infectivity, while GTPases RAB7 and RAB9, components of late endosomes (LE), are only required for UK infection. These results suggest that UK and RRV strains employ different endocytic vesicular traffic during their entry to host cells. Using confocal microscopy, we also quantified the co-localization of UK and RRV particles with components of the endocytic pathway. We were able to co-localize in early times of infection (10-60 minutes) UK and RRV with components of ESCRT (HRS, TSG101 and VPS4A) and EE (EEA1 and RAB5) markers; however, only the UK strain co-localized with late endocytic markers (RAB7 and RAB9). In this work we have demonstrated the participation of the ESCRT machinery in the early events of viral infection. This is the first non-enveloped virus described to utilize the ESCRT machinery during cell entry. Moreover, we characterized in detail the trafficking of UK and RRV strains in the intracellular space. This work demonstrates the efficiency of genome-wide siRNA analysis as reverse genetics tools for studying virus-host interactions.

Introducción

Todos los clados conocidos son hospederos de gran variedad de virus, desde arqueas hasta plantas y animales superiores. Los virus son parásitos intracelulares obligados que se replican utilizando la maquinaria biosintética de la célula hospedera y, aunque poseen algunas de las características propias de los sistemas vivos, son realmente entidades infecciosas inanimadas y no son consideradas microorganismos[§].

El estudio de los virus ha sido clave para avances importantes en el área de la biología molecular, incluyendo la identificación de DNA como material genético, la naturaleza de los codones del código genético, el procesamiento del RNA mensajero, la presencia de secuencias poli (A) en el extremo 3' de los RNA mensajeros, el mecanismo de biosíntesis de proteínas, la identificación de elementos "enhancer", la caracterización de factores de inicio de la transcripción, la síntesis de DNA partiendo de un templado de RNA y la identificación de oncogenes, entre otros [1].

Generalidades de rotavirus

Los rotavirus son un género dentro de la familia *Reoviridae* y son reconocidos como los principales agentes etiológicos de las gastroenteritis infecciosas agudas graves en infantes. Estos virus fueron inicialmente identificados en 1969 como causantes de diarrea en ratones recién nacidos, en

[§]El debate de la clasificación de los virus como organismos vivos ha sido de larga duración y con pocos resultados. Los organismos, en biología elemental, poseen cualidades como capacidad de movimiento, respiración, respuesta al medio ambiente, alimentación, crecimiento y reproducción. De esta lista, los virus son solamente capaces de reproducirse y únicamente con la ayuda de una célula viva. Puede considerarse que responden al medio ambiente, pero resulta más exacto expresar que el medio ambiente selecciona de manera particular ciertos virus que se encuentran posibilitados para reproducirse. Los virus poseen una muy pequeña capacidad para la manufactura de biomoléculas: en la ausencia de la célula son enteramente inertes.

1973 en infantes y subsecuentemente en jóvenes de otros mamíferos y aves [2]. Tres décadas después de la primer descripción de rotavirus en humanos, se han hecho progresos significativos en la comprensión de la estructura del virus, su biología molecular y los mecanismos a través de los cuales causan la enfermedad. Existen varios grupos de rotavirus, dependiendo de sus características antigénicas (serogrupos, con base a la reactividad de VP6), y múltiples serotipos en cada grupo (definidos por los epítopes neutralizantes de VP4 y VP7). Hasta ahora se han descrito siete grupos (A-G), que difieren en sus características epidemiológicas, la especie animal donde más frecuentemente se identifican y la edad en la que son más prevalentes. Los grupos A, B y C se han encontrado tanto en animales como en humanos, y los rotavirus de los grupos D, E, F y G sólo se han aislado de especies animales. Los rotavirus del grupo A son los principales causantes de gastroenteritis infecciosas en niños; el grupo B se ha asociado a epidemias anuales de diarreas severas principalmente en adultos; los rotavirus del grupo C se han detectado esporádicamente en heces fecales de niños con diarrea y en brotes severos, principalmente en China [3].

Genoma

El genoma del rotavirus está constituido por once segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), cuyos tamaños varían de aproximadamente 660 pb, para el gen más pequeño, hasta aproximadamente 3300 pb para el gen más grande. Estos segmentos codifican para 6 proteínas no estructurales y 6 proteínas estructurales; estas últimas se organizan en tres capas concéntricas en el virión maduro (**Tabla 1**). Cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, excepto el gen 11, el cual contiene dos marcos abiertos de lectura que codifica para dos proteínas.

Cada partícula viral contiene exactamente 11 segmentos de RNA de doble cadena, lo que indica que la replicación y el empaquetamiento de las 11 especies de RNA es un proceso altamente coordinado [4].

Tabla 1. Categorización génica y funcional de las proteínas de rotavirus

Gen	Tamaño (bp)	Proteína ^a	Peso molecular (kDa) ^b	Localización en partículas	No. de copias por partícula ^c	Función
1	3,302	VP1	125	NC	12	RNA polimerasa dependiente de RNA, unión a RNA de cadena sencilla.
2	2,690	VP2	94	NC	120	Unión a RNA, formación de nucleocápside, requerida para la actividad de replicasa de VP1.
3	2,591	VP3	88	NC	12	Guanilil-transferasa, metil-transferasa, unión a RNA de cadena sencilla.
4	2,361	VP4	88	TLP	120	Antígeno de neutralización tipo P, proteína de unión a célula, trímero, virulencia, región de fusión.
5	1,281	NSP1	53	NS	0	Unión a RNA, proteína mas variable del género, antagonista de <u>interferón</u> , posible E3 ligasa viral.
6	1,356	VP6	41	DLP	780	Contiene determinantes antigénicos de grupo y subgrupo, trímero, requerida para la transcripción.
7	1.104	NSP3	34	NS	0	Unión a eIF-4G y Hsp90, sustituto de PABP en la traducción, unión al extremo 3' de los genes virales, dímero ácido.
8	1,059	NSP2	35	NS	0	Unión a RNA, actividad de NTPasa, octámero, cinasa NDP, actividad desestabilizadora de hélice, forma viroplasma en conjunto con NSP5.
9	1,062	VP7	38	TLP	780	Glicoproteína, trímero dependiente de calcio, antígeno de neutralización tipo-G
10	715	NSP4	28	NS	0	Glicoproteína transmembranal del RE, viroporina, receptor intracelular de DLPs, rol en la morfogénesis de TLPs, interacciona con la vía de autofagia, modula el calcio intracelular y la replicación del RNA, enterotoxina secretada de la célula, virulencia.
11	667	NSP5	26	NS	0	Fosfoproteína, unión a RNA, cinasa, forma viroplasma con NSP2, interacciona con VP2 y NSP6.
		NSP6	10	NS	0	Producto del ORF2 del gen11, interacciona con NSP5, presente en los viroplasma, unión a RNA.

^a Los polipéptidos virales son designados con base a lo descrito anteriormente [5].

^b Los datos corresponden a la cepa SA11 de rotavirus de simio.

^c Calculado de análisis estructurales de viriones purificados.

Los diferentes segmentos génicos de rotavirus comparten algunas características generales [3]:

- a) Las hebras de RNA de cadena positiva en los segmentos de dsRNA (equivalentes a los mRNAs transcritos de estos genes)

inician con una guanidina en el extremo 5', seguida por una secuencia conservada (5'- GGCUUUUAAA -3') dentro de la región 5' no codificante.

- b) Las hebras de RNA de cadena positiva terminan con la secuencia consenso 5'- UGUGACC -3', la cual contiene señales para la replicación del gen y expresión de las proteínas virales [6].
- c) Las hebras de RNA de cadena positiva del genoma de dsRNA, al igual que los mRNAs, no están poliadenilados en el extremo 3'.
- d) La cadena positiva de los segmentos de dsRNA, al igual que los mRNAs, tiene una estructura de cap en el extremo 5'.
- e) Los genes virales son ricos en A+U (58% a 67%).

Recientemente se ha reportado que en las regiones no traducidas (NTR) de los mRNAs de rotavirus existen señales de replicación que actúan en *cis*. Hasta ahora las secuencias identificadas representan señales para la replicación y la traducción de los RNAs mensajeros virales; sin embargo, aún no se han encontrado las señales necesarias para la encapsidación de los once diferentes segmentos en una sola partícula viral.

Estructura

El nombre rotavirus (del latín rota, que significa "rueda") fue adoptado con base en su morfología [7]. La estructura de partículas infecciosas de rotavirus se ha resuelto a una resolución casi atómica utilizando cristalografía por rayos-X y reconstrucción de imágenes de partículas individuales por crioelectro microscopía [8].

La partícula de rotavirus posee un diámetro de 1000 Å con una geometría icosaédrica con simetría T = 13, es grande comparada con muchos otros virus icosaédricos, que al igual que rotavirus, no están cubiertos por una envoltura de lípidos. El virión maduro está compuesto por tres capas

concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral y se les denomina TLPs (del inglés Triple-Layered Particles) (**Figura 1.1**) [4].

Nucleocápside y capa interna de proteínas

La nucleocápside de rotavirus posee una densidad de 1.34 g/cm^3 en CsCl y un coeficiente de sedimentación de 280S en sacarosa. La nucleocápside se compone de tres proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3; de estas proteínas, VP2 es la más abundante y forma la capa más interna que interacciona con los trímeros de VP6 de la capa intermedia y con el RNA genómico en el interior.

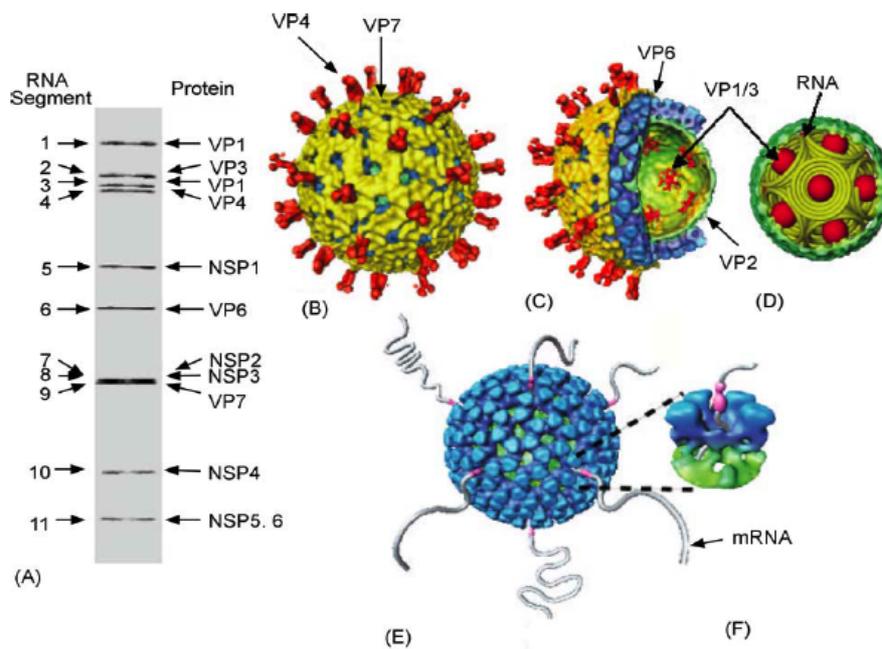


Figura 1.1. Características estructurales de rotavirus. (A) Patrón electroforético que muestra los 11 segmentos de dsRNA que posee el genoma de rotavirus. (B) Reconstrucción de la partícula de tres capas (TLPs). Las espículas de VP4 se muestran de color naranja y la capa externa compuesta por VP7 en amarillo. (C) Corte de una TLP donde se muestra la capa intermedia VP6 (azul), VP2 (verde) y las enzimas transcripcionales VP1 y VP3 (rojo) ancladas en la capa de VP2 en cada uno de sus ejes. (D) Esquema de la organización del genoma en rotavirus. Los segmentos del genoma son representados como espirales cónicas invertidas rodeadas por las enzimas transcripcionales (representadas como esferas rojas) dentro de la capa de VP2. (E y F) Modelo de DLPs transcripcionalmente activas. La transcripción resulta en la liberación simultánea del mRNA a través de canales localizados en los vértices del DLP icosaédrico. Modificado de [9].

La capa de proteínas formada por VP2 consiste en 120 moléculas organizadas en 60 dímeros con un arreglo icosaédrico T=1. Este arreglo de

120 unidades es característico de los virus de dsRNA, cualidad más conservada en los miembros de la familia *Reoviridae* y otros virus con dsRNA como $\phi 6$, el virus L-A de levaduras, y el virus de la enfermedad de la lengua azul (bluetongue virus), entre otros [3, 4, 9].

La proteína VP1 (1088 aminoácidos) es la RNA polimerasa viral. Las evidencias de su actividad de transcriptasa y replicasa, son: a) la secuencia de aminoácidos de VP1 posee 4 motivos altamente conservados en las secuencias de las RNAs polimerasas caracterizadas hasta ahora; b) VP1 se une específicamente al extremo 3' del mRNA viral; c) mutantes termosensibles de esta proteína no sintetizan RNA de cadena sencilla (ssRNA, del inglés single-stranded RNA) a temperaturas no permisibles; d) VP1 está presente en partículas virales transcripcionalmente activas; e) después de una exposición a luz ultravioleta, VP1 se encuentra entrecruzada con el RNA mensajero viral.

Al igual que VP1 y los ssRNAs, VP3 muestra afinidad estructural al término amino de VP2. La capacidad de unir covalentemente alfa-3,2-guanosina trifosfato (GTP) indica que es una guanililtransferasa, además de presentar actividad de metiltransferasa; estas dos cualidades derivan en la multifuncionalidad de VP3 como enzima de "capping". Complejos de VP1-VP2, producidos en el sistema de baculovirus recombinante, son capaces de replicar mRNA aun en ausencia de la proteína VP3, concluyendo que esta proteína es un componente esencial de los complejos de transcripción (síntesis de mRNAs) y no de los complejos replicativos (síntesis de dsRNA a partir de mRNA) [10, 11]. Por último, se ha descrito que partículas pseudo-virales pueden ensamblarse en la ausencia de VP1 y VP3 [12].

Capa intermedia

VP6, con un peso molecular de 41 kDa, constituye el 52% de la proteína viral y presenta una organización estructural altamente estable; estas características y la presencia de determinantes antigénicos conservados entre

todas las cepas de rotavirus del grupo A explica el por qué es el principal blanco antigénico en ensayos de diagnóstico.

La organización de VP6 en la capa externa consiste de 780 copias que están distribuidas como 260 trímeros arreglados con una simetría T=13 L. La importancia estructural de esta proteína en las partículas virales se ha demostrado en las interacciones presentes con ambas proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, y en la identificación de residuos proteicos de VP6 que interaccionan con VP2 y son esenciales en el ensamblaje de DLPs y en la actividad de transcriptasa [13]. La expresión de mutantes termosensibles de la proteína VP6 demostró que ésta no es necesaria para la actividad de replicasa de la nucleocápside [14]; sin embargo, es necesaria, estructuralmente, para la transcripción de mRNAs [12].

Capa externa

Las partículas virales maduras no exhiben actividad de transcriptasa; al eliminar la capa externa del virión, procedimiento que ocurre en la entrada del virus a la célula hospedera, se activa al complejo enzimático transcripcional. La importancia de la caracterización de las proteínas VP4 y VP7, componentes estructurales de la capa externa viral, se fundamenta en que son las responsables de los primeros contactos del virión con la célula hospedera, definiendo el tropismo del rotavirus. En concordancia con lo anterior, estas proteínas constituyen las principales generadoras de anticuerpos neutralizantes.

VP7 es la segunda proteína más abundante en el virión, después de VP6. Está constituida de 326 aminoácidos, tiene un peso molecular de 37 kDa y es codificada por el segmento de RNA 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa de rotavirus. Esta proteína presenta modificaciones post-traduccionales: la adición de dos cadenas de oligosacáridos del tipo de alta manosa, derivando en una N-glicoproteína .

La cápside externa de rotavirus formada por VP7, está compuesta por 260 trímeros. Esta proteína une calcio y está compuesta por dos dominios: el dominio I presenta un puente disulfuro que tiene un plegamiento Rossmann; el dominio II presenta tres puentes disulfuro y tiene un plegamiento jelly-roll b-sándwich. Tres subunidades de VP7 interaccionan para formar un trímero plano que se localiza sobre los trímeros de VP6 y que obstaculizan la cavidad donde los trímeros de VP4 tendrían que ensamblarse. Esta observación implica que las espículas de VP4 deben de unirse antes que VP7 a las TLPs durante el ensamble de la partícula y muestra lo complejo del proceso de ensamble de este virus en el retículo endoplásmico (RE).

La formación de puentes disulfuro intramoleculares y la presencia de iones calcio, localizados en un dominio conservado entre las diferentes cepas de rotavirus, determinan la madurez de esta proteína. De esta manera, mientras se conserve una concentración adecuada de calcio se mantiene una estructura íntegra del virión maduro. A bajas concentraciones de calcio, similares a las presentes en el citoplasma, se promueve la disociación de sus trímeros, resultando en la pérdida de la capa conformada por VP7 y VP4 con la consecuente activación de la transcriptasa viral [15, 16].

El papel de VP7 durante las interacciones tempranas del virus con la célula no es claro; sin embargo, se ha demostrado que esta proteína puede modular la función de VP4 durante la unión y proceso de entrada del virus a la célula [17] y se ha sugerido una posible interacción con la superficie celular después de la unión inicial del virus a través de VP4 con las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha x \beta 2$ [18-22].

VP4, codificada por el segmento 4 del genoma viral, forma trímeros que se organizan en 60 estructuras en forma de espículas, las cuales se extienden cerca de 12 nm sobre la superficie de VP7 [8]. Para el proceso de penetración de membrana, la proteína VP4 debe ser proteolíticamente procesada en dos fragmentos: VP8* (28 kDa, aa 1-247) y VP5* (60kDa, aa 248-776). Este procesamiento es efectuado por proteasas tipo tripsina que se encuentran en el

tracto gastrointestinal del hospedero. Los productos proteolíticos permanecen asociados de forma no-covalente en la superficie del virión [23]. Tras este procesamiento, las espículas de VP8/VP5 presentan estructuras bien definidas: dos dominios globulares distales, un cuerpo central y otro dominio globular denominado “dominio base” .

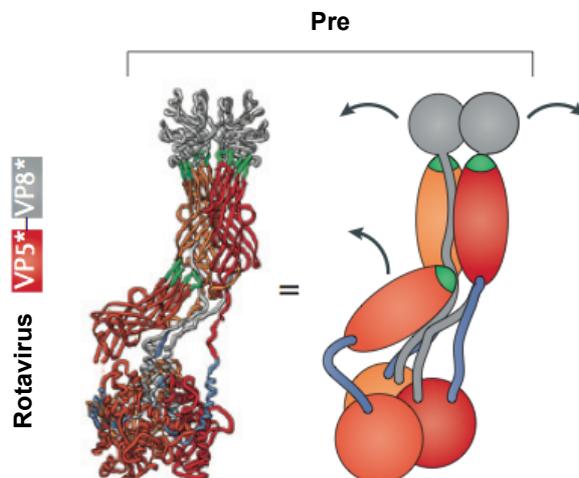


Figura 1.2. Estructura de la espícula viral, VP4. La proteína que conforma las espículas del virión maduro, VP4, está conformada por tres subunidades de VP5* (naranja) y dos subunidades de VP8* en la parte superior de la espícula. La estructura ejemplificada en la sección Pre, describe la conformación de VP4 prior su interacción con membranas lipídicas. Modificado de [4].

Las espículas de VP4, tras su procesamiento proteolítico, presentan una estructura única compuesta por dominios díméricos, tríméricos y asimétricos; esta organización es un elemento clave en los procesos tempranos del virus con su célula hospedera (i.e., unión y penetración) [24]. Dos dominios barril-beta de VP5* conforman el cuerpo central de la espícula, mientras que el tercer dominio barril-beta de VP5 se encuentra más cercano a la superficie de la cápside, interaccionando con VP7. En la base de la espícula, los tres dominios globulares forman una base trimérica anclada entre las capas de VP7 y VP6. Dos moléculas de VP8* se encuentran en la cima de dos moléculas verticales de VP5*; la tercera molécula de VP8* se encuentra desordenada o posiblemente se desprende tras el proceso proteolítico [8, 24-27] (**Figura 1.2**).

Ciclo replicativo

El conocimiento sobre el ciclo replicativo de rotavirus se ha derivado de estudios realizados principalmente en células epiteliales de riñón de mono (MA104) (**Figura 1.3**). En estas células el ciclo de replicación es rápido, donde la producción máxima de virus a 37⁰C se encuentra a las 12 horas post-infección.

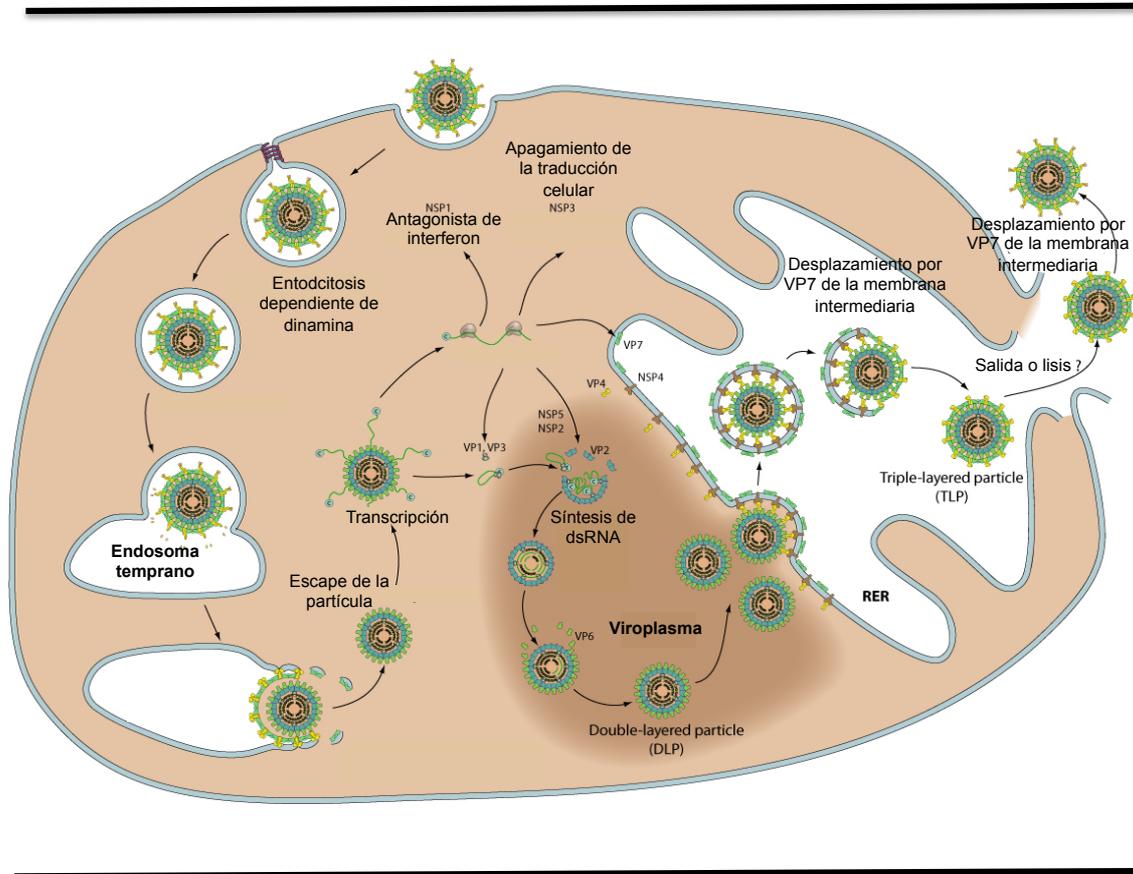


Figura 1.3. Ciclo de replicación de rotavirus. El ciclo replicativo de rotavirus inicia con la unión e internalización del virión maduro (TLPs) al espacio intracelular. La pérdida de la tercera capa y liberación de DLPs al citosol activa la polimerasa interna, iniciando la transcripción de mRNA virales, los cuales son dirigidos a la producción de proteína viral y la replicación de nuevo genoma viral. Las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 interaccionan para formar grandes inclusiones denominadas viroplasma, en éstos se lleva a cabo la replicación genómica y formación de nuevas DLPs. El ensamble de la última capa del virión maduro se lleva a cabo en el retículo endoplásmico con ayuda de la proteína no estructural NSP4.

Unión a la célula hospedera

La identificación de receptores específicos localizados en la superficie de

la membrana celular ha resultado en una descripción más detallada de las interacciones tempranas del virus y la célula hospedera, lo que ha derivado en un conocimiento más extenso de las características que determinan el tropismo celular específico del virus.

El primer paso en el ciclo replicativo de rotavirus es su unión a moléculas presentes en la membrana celular de la célula hospedera para su posterior entrada al espacio intracelular. Se ha descrito para la cepa de rotavirus RRV, y algunas otras, que su unión a la superficie de la célula hospedera se ve claramente reducida tras el tratamiento de éstas con neuraminidasa (NA); lo anterior indica el rol de ácidos siálicos en el paso de la unión de estos virus a la célula. Sin embargo, también se han descrito cepas, como la cepa bovina UK, que son capaces de unirse/infectar a células tratadas con NA y son denominadas NA-resistentes. Se ha demostrado que los virus NA-resistentes se unen a ácidos siálicos internos de glicolípidos, como el gangliósido GM1 [28], que son resistentes al tratamiento con NA. Para las cepas de rotavirus sensibles a NA se ha descrito que el sitio de unión del virus a estos motivos se encuentra en una ranura localizada en la superficie de la proteína VP8*. Para las cepas NA-resistentes, se ha demostrado que la VP8* exhibe diferencias estructurales que pudieran definir su afinidad por motivos de ácidos siálicos internos [29]. Estudios recientes indican que al menos una cepa de rotavirus NA-resistente no se une a SA, pero si a HBGA (del inglés Histo-Blood Group Antigen) [30, 31].

La entrada del rotavirus a la célula hospedera es un proceso que consiste en múltiples pasos y la identificación de co-receptores celulares para rotavirus es un área de investigación importante. Varias integrinas como $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha x\beta 2$ están implicadas en etapas post-unión [18, 19, 21].

La cepa de rotavirus RRV interactúa con la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través de un motivo DGE presente en la proteína VP5*; posiblemente esta unión es favorecida por un cambio en la conformación de VP4 inducido por la primera interacción con SA [32]. Por otro lado, se ha sugerido que VP7 interacciona

con las integrinas $\alpha\beta 2$ y $\alpha\beta 3$ por medio de motivos GPR y CNP, respectivamente. Estudios recientes en los que se evalúa la participación de estas dos integrinas en células permisivas utilizando RNAi, sugieren que pudieran no tener un papel determinante en el proceso de entrada de rotavirus [21].

Otra proteína involucrada en la unión y reconocimiento de los rotavirus con su célula hospedera es la proteína de choque térmico constitutiva hsc70 [22, 33, 34]. Anticuerpos monoclonales contra esta proteína inhiben la infectividad de varias cepas de rotavirus sin bloquear la unión del virus a la superficie celular, lo que sugiere que esta interacción ocurre en un paso posterior a la unión del virus a la célula hospedera [33]. Se ha sugerido que, sin importar qué molécula utilizan las distintas cepas de rotavirus (NA-sensibles o NA-resistentes) en su primera interacción con la célula, ambos tipos de virus interaccionan, en un paso posterior a la unión inicial, con la integrina $\alpha\beta 3$ y con la proteína de choque térmico hsc70.

Se ha también demostrado la participación de balsas lipídicas (rafts) en la entrada de rotavirus [21]; la infectividad de varias cepas de rotavirus se ve dramáticamente afectada tras el tratamiento de células con detergentes que desorganizan estos microdominios. Además, es importante considerar que se ha descrito que todos los receptores hasta el momento definidos como importantes en el proceso de unión de rotavirus a la célula hospedera se encuentran asociados con este tipo de microdominios lipídicos [19].

Penetración y desnudamiento

El ciclo de replicación de rotavirus (**Figura 1.3**) inicia con la unión y penetración de la partícula viral a través de la membrana plasmática. Existe información detallada sobre la entrada a la célula hospedera de gran número de virus con membrana lipídica (virus envueltos); sin embargo, el mecanismo mediante el cual virus sin membrana (virus no envueltos) entran a la célula no es del todo comprendido [4].

En el caso de rotavirus, ingresa a la célula a través de un proceso endocítico, el cual puede variar dependiendo de la cepa de virus. Así, el rotavirus bovino UK entra por endocitosis clásica mediada por clatrina, mientras que el rotavirus RRV lo hace a través de una vía endocítica no caracterizada completamente, pero que depende de dinamina, colesterol y es independiente de clatrina y caveolina [20, 35]. La GTPasa dinamina se encarga de escindir la vesícula primaria de la membrana celular, promoviendo su tráfico y maduración al endosoma temprano (EE).

Posterior al ingreso a la célula, el tráfico vesicular de rotavirus se ha asociado con varias proteínas asociadas a procesos endocíticos. Por ejemplo, se ha demostrado que la mayoría de las cepas de rotavirus son sensibles al tratamiento con bafilomicina A1, fármaco que bloquea la actividad de la ATPasa vacuolar encargada de la acidificación de los endosomas [20, 36]. Igualmente, se ha descrito que las GTPasas Rab4 y Rab5, componentes genéricos de los endosomas tempranos, son necesarias en la entrada de la cepa RRV de rotavirus; adicionalmente, se mostró que la proteína VP5* co-localiza a tiempos tempranos con estos dos marcadores endosomales, confirmando que la cepa RRV utiliza una ruta endocítica en su proceso de entrada [37, 38].

Aunada a la descripción de componentes celulares que participan en la fase de entrada de rotavirus a la célula, recientemente se propuso un modelo, basado en la estructura cristalográfica de VP4 y de su dominio VP5, en el que se sugiere que durante este proceso ocurren cambios conformacionales en las proteínas de superficie del virus (**Figura 1.4**).

Este modelo postula que, durante el tráfico de la vesícula endocítica que engloba al virus hacia los endosomas tempranos, la concentración de calcio disminuye, provocando la disociación de los trímeros de VP7 de la partícula viral. Esto induce un cambio conformacional en la espícula de VP4, durante el cual los trímeros de VP5* se pliegan sobre si mismos para adoptar una

conformación parecida a un paraguas ("fold-back") [8, 25, 27]. Esta nueva conformación de VP5* expone una región hidrofóbica de la proteína que le permite interactuar con la membrana endosomal, causando su desestabilización [26].

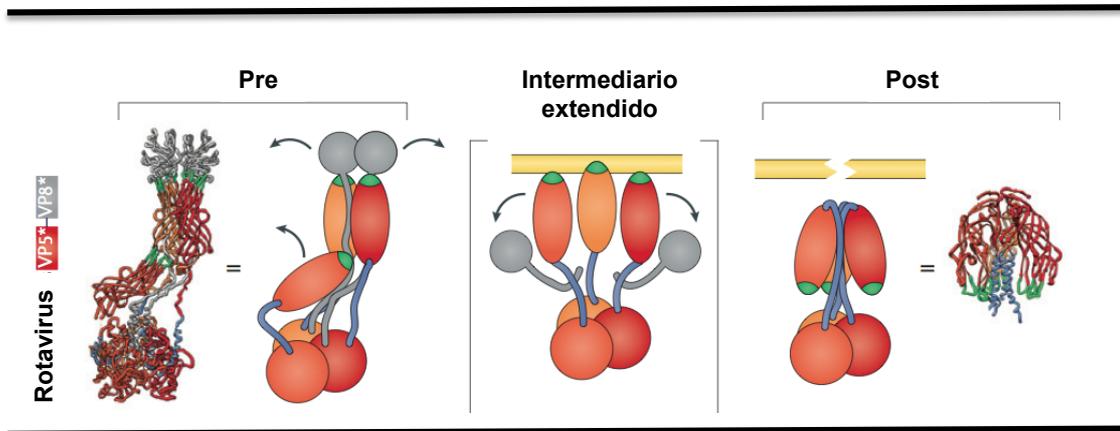


Figura 1.4. Cambios conformacionales de la proteína VP4 durante el proceso de entrada de rotavirus a la célula. Los motivos hidrofóbicos (representados en verde) de las subunidades de VP5* (representadas en naranja), interactúan con membranas lipídicas endosomales (representadas en amarillo), promoviendo un cambio estructural en la espícula de rotavirus, denominado "intermediario extendido". Finalmente, la conformación "folded back" de la proteína VP4, se correlaciona con la ruptura de la membrana lipídica. El mecanismo por el cual este cambio conformacional desestabiliza a la membrana endosomal se desconoce. Modificado de [4].

Finalmente, se propone que i) la disociación de VP7 que origina el desnudamiento del virus, ii) el cambio conformacional de VP5 y iii) la ruptura de la membrana endosomal provocan que las DLPs salgan del compartimento endosomal hacia el citosol, donde da inicio la transcripción del genoma viral [8, 25-27].

Transcripción y traducción

Como se mencionó en el párrafo anterior, durante la penetración del virus a la célula la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa. Aunque el momento preciso y el mecanismo de este evento se desconoce, la remoción de la capa externa del virión resulta en la activación de la transcriptasa viral .

Después de la internalización del virus al citoplasma celular, el genoma

viral es transcrito a partir de las DLPs, conformadas por VP1/VP2/VP3/VP6. La síntesis de los transcritos virales es mediada por la RNA polimerasa viral VP1. Los mRNAs se extruyen de la DLP hacia el citoplasma a través de canales localizados en los ejes de simetría tipo 5 de la partícula. Los RNAs mensajeros virales sintetizados pueden realizar dos funciones: a) servir como molde en la traducción de proteínas virales; b) servir como molde en la replicación del genoma viral [39].

La traducción de los mRNAs de rotavirus se efectúa tanto en polisomas libres como unidos al retículo endoplásmico. Un aspecto particular de la infección por rotavirus consiste en que a medida que progresa la síntesis de las proteínas virales se disminuye la síntesis de las proteínas celulares, la cual finalmente se abate casi en su totalidad. La inhibición de la síntesis de proteínas celulares está relacionada con la actividad de la proteína viral NSP3 [40].

La regulación de la traducción celular por rotavirus se realiza a distintos niveles. Uno de los primeros fenómenos de regulación traduccional que se observan en células infectadas con el virus es la fosforilación del factor del inicio de la traducción eIF2 [41], lo cual inhibe su función. Esta proteína es esencial para la traducción de proteínas celulares pero no para proteínas virales. La mayoría de los mRNAs celulares tiene en su extremo 5' una estructura de cap y en el 3' una cola de adeninas (poli-A). El cap del 5' une al complejo de inicio de traducción eIF4F, mientras que la cola poli-A interacciona con PABP, proteína que une a la cola poli-A. Finalmente, la interacción de PABP con el factor eIF4G (componente del complejo eIF4F) hace que los mRNAs celulares se circularicen, lo cual hace más eficiente su traducción. En células infectadas, la proteína no estructural NSP3 interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF4G [42], y promueve que la PABP se desplace al núcleo. Estos dos efectos contribuyen a disminuir la circularización de los mRNAs celulares, con la consecuente disminución de su traducción. Aunado a lo anterior, la infección de rotavirus regula el transporte de mRNAs con cola poli-A del núcleo al citoplasma, generando una acumulación

de mRNAs celulares en el núcleo, y favoreciendo así la traducción de los mRNAs virales [43].

Replicación del genoma y Morfogénesis

La síntesis del dsRNA genómico empieza a detectarse aproximadamente a las 3 - 4 horas post infección, y se lleva a cabo en inclusiones perinucleares electrodensas localizadas en el citoplasma denominadas viroplasmos. Se ha encontrado que la proteína no estructural NSP5 posee dominios de interacción con NSP2, asociación que resulta en la hiperfosforilación de NSP5, lo que es aparentemente necesario para la formación de viroplasmos. Los viroplasmos constituyen los sitios de ensamble de las nuevas DLPs [4, 44-46].

El proceso de replicación inicia cuando los RNA mensajeros virales (RNA+), transcritos a partir de DLPs, se incorporan a complejos proteicos llamados intermediarios de replicación (RIs), los cuales dirigen la síntesis de RNA de polaridad negativa para la producción del dsRNA genómico. Durante estos eventos participan algunas de las proteínas no estructurales del virus que se encuentran asociadas a las partículas virales. Los RIs se forman a partir de un complejo inicial denominado precoreRI, conformado por las proteínas VP1/VP3/NSP2/NSP5, a partir del cual se ensambla el coreRI, que contiene, además de las proteínas anteriores, VP2. Finalmente se conforma el complejo llamado VP6RI con las proteínas VP1/VP2/VP3/VP6/NSP2, que dará lugar a las DLPs. Las DLPs recién sintetizadas geman a través de la membrana del retículo endoplásmico, proceso durante el cual adquieren las proteínas de superficie del virus y se producen viriones maduros, como se discute a continuación [3, 4, 39, 47]

En células infectadas la membrana del RE se encuentra modificada con las glicoproteínas virales NSP4 (que funciona como receptor de las DLPs) y VP7. La interacción de NSP4 con VP6 en la superficie de los DLPs media la gemación de las partículas de doble capa hacia el interior del RE; durante esta gemación las partículas adquieren una cubierta lipídica temporal que contiene,

además de NSP4, las proteínas de superficie VP4 y VP7, así como pequeñas cantidades de otras proteínas no estructurales. La envoltura lipídica y la proteína no estructural NSP4 es entonces removida, posiblemente por un incremento en la interacción de VP6 con VP7 estimulado por la alta concentración de calcio presente en el lumen del RE. Durante este proceso la proteína VP4 se posiciona correctamente en la partícula permitiendo la formación de viriones maduros con sus tres capas de proteína. Finalmente estos virus se liberan al medio mediante la lisis de la célula [3, 4, 47, 48].

Vías celulares implicadas en la entrada de rotavirus

Endocitosis y tráfico intracelular

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos, denominadas cargos (**Figura 1.5**). Este proceso celular consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. Las propiedades físicas y químicas de las moléculas cargo dictan la naturaleza de las estructuras vesiculares primarias que participan en su internalización. Una vez internalizados dentro de vesículas endocíticas primarias, los cargos son dirigidos a su destino por el sistema de tráfico endosomal; éste es responsable de destinar, reciclar, degradar y almacenar los cargos entrantes. Este proceso celular está compuesto por un conjunto de organelos que poseen características distintivas, tales como composición proteica, tamaño, pH, entre otras .

Los compartimentos más caracterizados de esta vía son los endosomas tempranos, en maduración, tardíos, de reciclaje y lisosomas. Es importante mencionar que el proceso endocítico es unidireccional y conlleva la maduración secuencial de sus compartimentos.

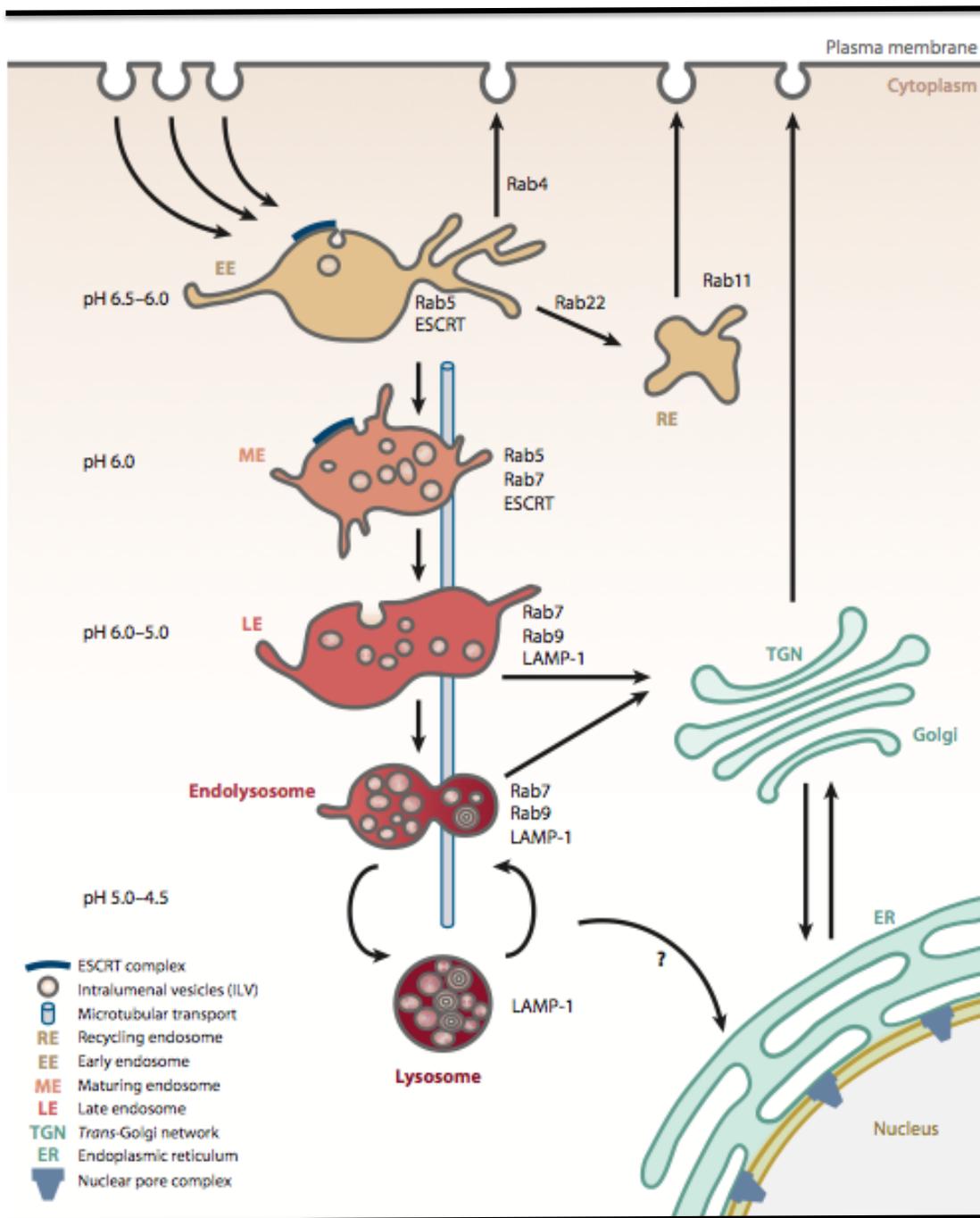


Figura 1.5. La vía endosomal. Los endosomas tempranos (EE) se encuentran usualmente localizados en la periferia del citoplasma y contienen a la GTPasa RAB5; tras su acidificación, maduran a endosomas tardíos (LE). En este proceso, se generan compartimentos endosomales intermedios que presentan componentes de ambos EE y LE; estos endosomas se denominan endosomas en maduración (ME). Finalmente, los LE pueden madurar a lisosomas, compartimento donde se presenta una degradación activa de proteínas. Modificado de [49].

Estos organelos difieren en localización y estructura y son generalmente definidos por su composición de Rab GTPasas. Las Rab GTPasas son indispensables para la entrega adecuada de cargas a los organelos correctos

ya que controlan la movilidad y fusión específica de los compartimentos endocíticos; esta última función es vital en el proceso de maduración de los mismos (**Figura 1.5**) [49-51].

Además de los componentes genéricos de la vía endocítica, en años recientes se ha caracterizado robustamente el complejo endosomal utilizado para transporte, ESCRT (de sus siglas en inglés Endosomal Sorting Complex Required for Transport), el cual facilita el tráfico de proteínas ubiquitinadas de endosomas a lisosomas pasando por los cuerpos multivesiculares (MVB, del inglés Multivesicular Bodies) (**Figura 1.6**). El descubrimiento de la vía ESCRT en el tráfico endosomal y su participación en la morfogénesis de MVBs, tuvo un avance inesperado gracias a estudios realizados con proteínas de transporte (VPS, del inglés vacuolar protein sorting) en *Saccharomyces cerevisiae*. En la caracterización de cepas de levadura con mutaciones en estas proteínas, se identificó la falta de vesículas internas en los compartimentos prevacuolares, además de la acumulación de los cargos en estos organelos. Una caracterización más exhaustiva de los productos de esos genes llevaron al descubrimiento de los distintos complejos heteropoliméricos que conforman la vía canónica de ESCRT.

Muchas proteínas de membrana plasmática están en flujo constante a través de vías de tráfico celular. Algunos receptores, tales como el de la transferrina, se internalizan continuamente en endosomas de reciclaje y son regresados a la superficie celular. Otros, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), son internalizados en vesículas intraluminales (ILVs) en MVBs. Estos MVBs se fusionan con lisosomas, resultando en degradación de su cargo por hidrolasas ácidas lisosomales. Una característica que presentan estos cargos, y que se ha descrito como una de las señales activadoras de la vía de ESCRT, es su mono-ubiquitinación en la superficie celular. En levaduras, la vía análoga está involucrada en el tráfico hacia la vacuola y ambas son orquestadas por la maquinaria de ESCRT.

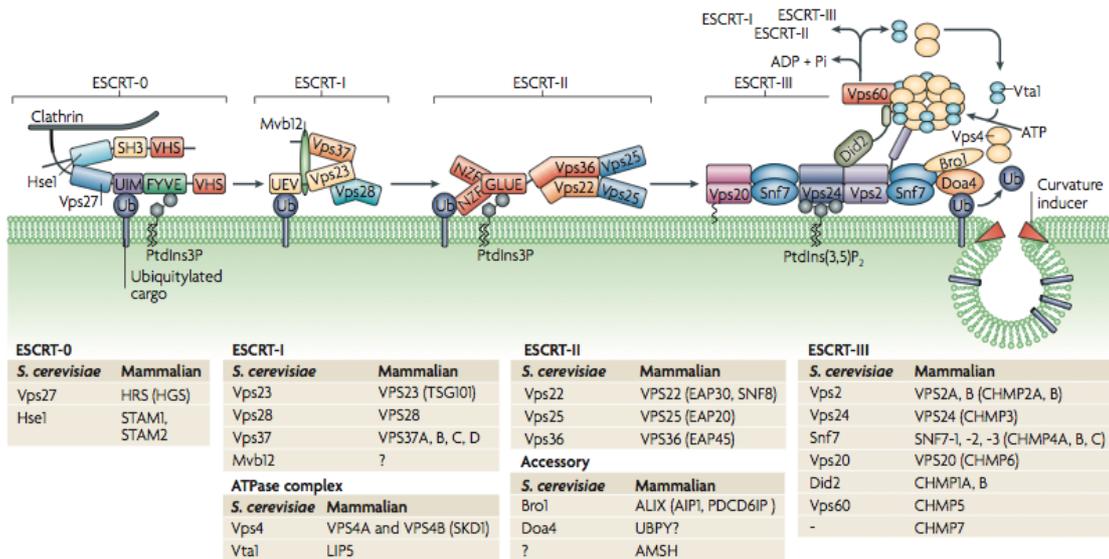


Figura 1.6. Esquema de la maquinaria de ESCRT. Cuatro complejos de ESCRTs son reclutados por los endosomas por medio de interacciones con membranas lipídicas; proteínas celulares como clatrina y/o ubiquitina (Ub); además de interacciones proteína-proteína entre los mismos componentes de la maquinaria ESCRT. El reconocimiento de membranas lipídicas es efectuado por distintos componentes: i) el fofatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P) es reconocido por el dominio FYVE de Vps27 (ESCRT-0) o el dominio GLUE de Vps36 (ESCRT-II); ii) el PtdIns(3,5)P2 por Vps24 (ESCRT-III) podrían contribuir a la temprana o tardía localización endosomal de los componentes. Todos los ESCRTs, excepto el ESCRT-III, reconocen y se unen al cargo ubiquitinilado, ya sea por i) un motivo de interacción-ubiquitina (UIM) presente en componentes de ESCRT-0; ii) un dominio variante de ubiquitina E2 (UEV) presente en componentes de ESCRT-I; o iii) puede ser reconocida por el dominio GLUE de Vps36 (ESCRT-II). ESCRT-III orchestra los últimos pasos en la vía, donde los complejos son desensamblados por la AAA+ ATPasa, Vps4. El proceso de invaginación de vesículas al lumen de los endosomas, es facilitada por un factor inductor de curvatura. Los componentes del ESCRT facilitan el reclutamiento de esos factores a la membrana endosomal, tales como el ácido lisobifosfatídico (LBPA); u otras proteínas celulares que presentan glicosilaciones en el lado luminal de la membrana, tales como las tetraspaninas. Los paneles de hasta abajo enlistan las subunidades de ESCRT, así como sus proteínas accesorias en *Saccharomyces cerevisiae* y los análogos en mamífero. Modificado de [52].

La maquinaria de ESCRT se compone por 4 complejos conocidos como ESCRT-0, -I, -II, -III y un conjunto de proteínas accesorias. El complejo ESCRT-0 es reclutado desde tiempos tempranos, en compartimentos que contienen al cargo, por medio de interacciones con proteínas y lípidos contenidas en la vesícula primaria. La maduración de esta vesícula primaria a cuerpos multivesiculares es orquestada por interacciones proteína-proteína entre los complejos ESCRT -I, -II y -III además de la participación de las RabGTPasas. La formación de los MVBs es efectuada por el complejo ESCRT-III y representa el término en la contribución de esta maquinaria en este

proceso; por último, se lleva a cabo una liberación del cargo en lisosomas y el desensamble de los ESCRTs de la membrana endosomal (**Figura 1.6**).

Los ESCRT-0, -II y -III interactúan preferentemente con 3-fosfoinositoles, enriquecidos en endosomas en maduración, usando diferentes tipos de dominios de reconocimiento de lípidos. Aunque los estudios de fraccionamiento celular sugieren que los ESCRTs son predominantemente citosólicos y son reclutados a endosomas tras la detección del cargo en la superficie celular, estudios ultraestructurales cuantitativos en células T y macrófagos indican que, al menos en estas células, la mayoría (80%) de ESCRT-0 y ESCRT-I están asociados a membrana, con la mayor abundancia (45%) en estructuras tubo-vesiculares, características de los endosomas en maduración. Además de dominios de unión a lípidos, los componentes de ESCRT-0, -I y -II, presentan dominios de interacción con ubiquitina, señal necesaria para la liberación de algunos cargos a lisosomas.

Muchas proteínas asociadas a ESCRT tienen roles celulares alternativos al tráfico endosomal que también son explotados por virus. Por ejemplo, elementos de la maquinaria de ESCRT son reclutados por retrovirus, como VIH-1, el virus de leucemia murina (MLV) y el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) para gemación desde la membrana plasmática, un proceso que es topológicamente idéntico a la formación de MVBs, pero que genera la gemación de vesículas de la membrana plasmática. Este proceso es utilizado por estos virus en su proceso de salida de la célula hospedera [52, 53, 54].

La célula hospedera impone múltiples barreras para la entrada de virus. Sin embargo, éstos son capaces de utilizar procesos celulares fundamentales para lograr este paso crucial en su ciclo replicativo y entregar su material genético al espacio intracelular. Las diferentes formas en las que los virus pueden entrar a la célula están principalmente definidas por las interacciones entre las partículas virales y sus receptores sobre la superficie celular. Estas interacciones tempranas determinan los mecanismos utilizados por el patógeno para su unión, internalización, tráfico celular y por último,

penetración al citosol. En células de mamíferos se presentan dos clases importantes de procesos endocíticos, dependiendo de si la internalización conlleva partículas grandes (fagocitosis) o moléculas pequeñas (pinocitosis). Estas vías difieren en el tipo de cargo que internalizan, en la maquinaria proteica que participa en el proceso endocítico y en el destino del material internalizado. A continuación se describen brevemente cada una de estos procesos y las estrategias que algunos virus utilizan para entrar a la célula hospedera utilizando estos variados procesos celulares [55].

Tipos de endocitosis

Fagocitosis

Este mecanismo está mayormente restringido a células especializadas como macrófagos y amibas; su función principal en la célula es internalizar partículas grandes como bacterias o desechos celulares. En la fagocitosis, la unión del cargo a la membrana celular inicia la formación de una vesícula endosomal de varias micras de diámetro que conlleva rearrreglos del citoesqueleto de actina. Se ha descrito que la GTPasa dinamina escinde esta vesícula endosomal, denominada fagosoma, para iniciar su proceso de maduración. El proceso de maduración del fagosoma al lisosoma ocurre a través de un tráfico celular clásico con la participación de los endosomas tempranos y tardíos, en ese orden, y utiliza a las GTPasas Rab5 y Rab7, componentes de esos compartimentos, respectivamente. Además, se sabe que varias GTPasas que regulan procesos de polimerización de actina participan en esta vía endocítica, como lo son: RhoA, Cdc42, Arf6, RhoG, Rac1 y Ras [49].

Mimivirus, un patógeno de amibas, utiliza esta estrategia para entrar a su hospedero. Este virus mide aproximadamente 400 nm de diámetro y es el cuarto virus más grande descrito, después de *Pithovirus sibericum*, *Megavirus chilenis* y *Pandoravirus*. Hasta el momento, se sabe que la entrada de mimivirus a la célula genera un rearrreglo del citoesqueleto de actina y

promueve la activación de la vía PI3K, además de depender de la GTPasa dinamina-II [56]. El virus de herpes simplex 1, el cual causa herpes en humanos, es otro patógeno que utiliza fagocitosis en su proceso de entrada; se ha descrito que también depende de dinamina-II y de GTPasas tipo Rho, encargadas de la polimerización de actina.

Pinocitosis

Endocitosis mediada por clatrina

Este mecanismo es el mejor caracterizado en la entrada de moléculas a la célula y es denominado así por la proteína clatrina, proteína encargada de formar la vesícula primaria. Esta proteína genera un complejo conformado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada “el trípode” de clatrina. El proceso de endocitosis inicia con el reclutamiento de este complejo a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras, siendo el complejo AP-2 el más caracterizado [57].

La organización progresiva de clatrina en la membrana celular genera una curvatura que deriva en una vesícula endocítica. Dinamina es la proteína encargada de escindir esta estructura de la membrana celular. La formación de vesículas cubiertas por clatrina es un proceso activado por el cargo presente en el espacio extracelular, el cual inicia la formación de vesículas *de novo* en su sitio de unión [57]. Se ha observado que la entrega de vesículas de clatrina a los endosomas tempranos (EE) es un proceso relativamente rápido que toma aproximadamente 1-2 min, es en ese sitio donde se presenta el desensamble del trípode de clatrina. Los virus envueltos Semliki Forest (SFV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) fueron los primeros descritos en utilizar esta vía para entrar a su hospedero. Estos virus son capaces de entrar al espacio citoplásmico desde los EE [58]. El tráfico de la endocitosis mediada por clatrina no se restringe a los EE, se ha observado que las moléculas cargadas que entran por esta vía, pueden llegar a los endosomas tardíos (LE) en un lapso de 10 a 20 min. Esta vía es la más

utilizada por virus en procesos de entrada, y se observa en virus como hepatitis C, dengue y reovirus [57].

Endocitosis mediada por caveolina

Una característica de esta vía de endocitosis es que la formación de las vesículas primarias endocíticas depende de colesterol, balsas lipídicas y de una señalización compleja que conlleva tirosín-cinasas y fosfatasas. Es un proceso iniciado por la unión del cargo a su ligando en la membrana celular, lo que desencadena que una pequeña proteína dimérica, llamada caveolina, forme la vesícula primaria, denominada caveola. Después de su internalización, el cargo pasa a través de los endosomas temprano, tardío y es generalmente transportado finalmente al retículo endoplásmico. La gran mayoría de los virus que utilizan esta forma de entrada tienen como receptores glicoesfingolípidos y, tras ser liberados en el RE, hacen uso de las tiol-reductasas características de este compartimento para iniciar su proceso de desencapsidación y penetración al citosol. Esta estrategia es empleada por poliomavirus, virus no envuelto de DNA que se replica en el núcleo, así como por SV40 [59] y el virus BK [60].

Esta vía endocítica es relativamente lenta; dependiendo del virus y del tipo de célula, el proceso de penetración que ocurre en el ER puede tomar de 6 a 12 horas después de la internalización de la vesícula primaria [59].

Vías endocíticas inusuales

Además de las vías altamente caracterizadas descritas anteriormente, existe una gran cantidad de información de mecanismos adicionales variados, muchos de los cuales son utilizados por patógenos virales. Estas estrategias endocíticas pueden no presentar vesículas primarias detectables, no dependen de clatrina o caveolina, o presentan una combinación no descrita en el uso de componentes celulares.

El virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) hace uso de estrategias inusuales para entrar a la célula. Este es un virus de RNA no envuelto, y se ha descrito que su entrada no depende de clatrina, caveolina y flotilina, otra proteína que es capaz de formar vesículas primarias en la membrana celular. No depende de ninguna de las isoformas de dinamina ni del citoesqueleto de actina. Sin embargo, se ha observado que LCMV es capaz de llegar a los endosomas tardíos sin pasar por endosomas tempranos, haciendo uso de un tráfico intracelular desconocido; una vez en los LE, este virus inicia su proceso de penetración al espacio citosólico [61].

El virus del papiloma humano es un virus no-envuelto que entra por una vía celular que también es independiente de clatrina, caveolina y flotilina; sin embargo, a diferencia del virus LCMV, este virus requiere de la polimerización de actina y sigue un proceso de maduración canónico que va desde EE y LE a lisosomas, en donde el virus es activado acídicamente para iniciar su proceso de penetración.

Existen gran cantidad de virus que utilizan estas vías inusuales de entrada, y aunque la caracterización de sus distintas estrategias sigue incompleta, pareciera que estos virus han evolucionado para utilizar formas de endocitosis aún no descritas en la biología celular. Es de particular importancia el estudio y caracterización de este tipo de estrategias que nos enseñan no sólo sobre la naturaleza del virus, sino sobre la versatilidad de la célula para llevar acabo este proceso biológico vital.

Uniones estrechas

Las uniones estrechas (UE) son áreas morfológicamente distintivas y altamente reguladas de contacto próximo entre las membranas plasmáticas de células epiteliales y endoteliales vecinas (**Figura 1.7**). Se ubican en la cara basolateral de la membrana y están orientadas hacia el extremo más apical de la misma, su función principal es formar una barrera física que regula el paso selectivo de solutos a través del espacio paracelular. A la fecha se han

identificado más de 40 proteínas en las uniones estrechas, categorizadas principalmente en tres tipos de proteínas transmembranales (JAM, claudinas, ocludina) y una familia de proteínas citoplásmicas (placa citoplásmica: ZO, PARs) características de estas uniones [62].

Aunque la función clásica de las uniones estrechas es la regulación de la permeabilidad paracelular y la formación de una barrera de difusión apical-basolateral, recientemente, se ha descrito que las UE regulan varios mecanismos de señalización que guían la expresión génica, proliferación y diferenciación celular [64].

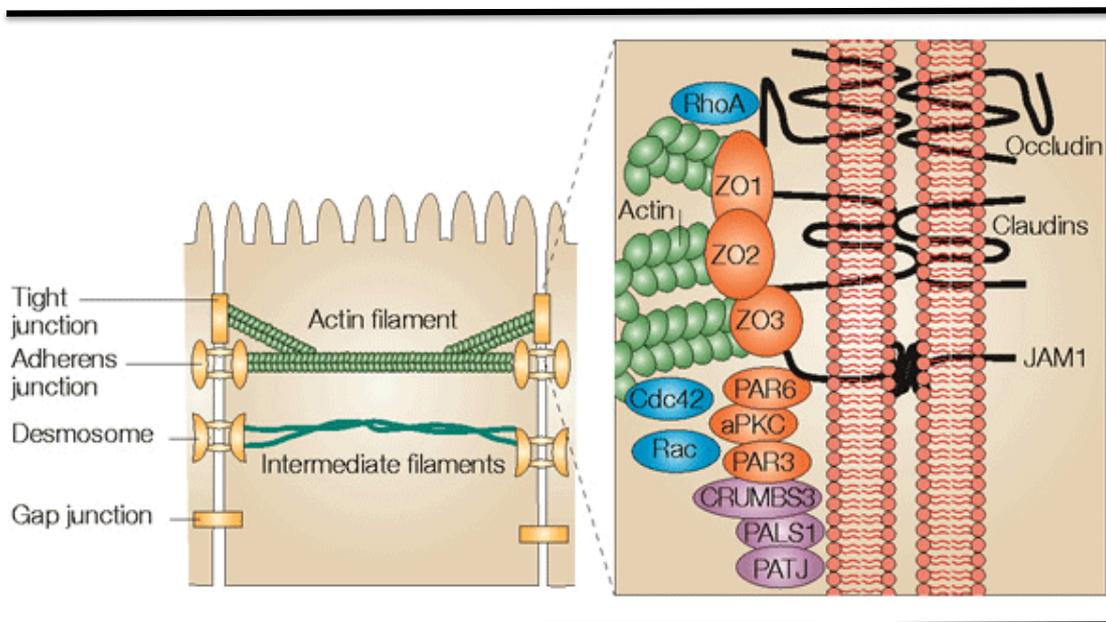


Figura 1.7. Organización de las uniones estrechas. Se han descrito tres clases de proteínas transmembranales que conforman a las uniones estrechas: ocludina, claudina y JAMs; se encuentran conectadas con las proteínas adaptadoras de la zona ocluyente: ZO1-2 y 3. Muchas otras proteínas son esenciales, como PAR6, la cinasa PKC y PAR3. Este complejo, importante en la polarización celular, es regulado por la GTPasa CDC42 y el complejo CRUMBS3–PALS1–PATJ, necesario en el ensamble de las uniones estrechas. Los roles de las GTPasas RhoA y Rac en la regulación de UE, no han sido descritos a profundidad, pero se ha sugerido que la fosforilación de ocludina dependiente de RhoA es crucial en la formación de uniones estrechas. Modificado de [63].

Asimismo, las UE son blanco de varios tipos de patógenos; estas interacciones llevan a una pérdida de la estructura de la barrera epitelial. Varios virus utilizan componentes de la UE como receptores celulares. Se ha descrito que el virus de la hepatitis C utiliza a claudina-1 como co-receptor,

mientras que reovirus utiliza a la proteína JAM-A como el receptor principal en su proceso de entrada. En algunos casos la unión de virus a componentes de las UE favorece su entrada a las células (virus de hepatitis C, reovirus, coxsakievirus), mientras que en otros casos la interacción ayuda a pasar la barrera de difusión para tener entonces acceso al receptor principal en la cara basolateral de la célula, como en el caso de adenovirus [65-67].

Generalidades de la estrategia experimental

RNA de interferencia

El RNA de interferencia es un sistema de defensa innato que poseen gran cantidad de organismos eucariotes y que es activado por la presencia de RNA de doble cadena; esta vía permite la degradación y/o regulación traduccional de los mRNAs con los que la molécula de dsRNA presente similitud. Inicialmente se describió a la RNAi como un sistema para eliminar secuencias de ácidos nucleicos ajenos o redundantes en la célula (i.e., genoma viral, transposones), evitando su integración al genoma o la alteración de procesos celulares. Sin embargo, en la actualidad se conoce que esta vía permite que la célula regule de manera orquestada la expresión de gran cantidad de genes, ya sea en respuesta a estímulos (i.e., falta de nutrientes, infecciones virales) o como parte de procesos de diferenciación celular, entre otros.

En mamíferos, como en muchos eucariotes, los microRNAs (miRNAs) y los RNAs interferentes pequeños (siRNAs) se han descrito como efectores de la vía de RNA de interferencia, participando como reguladores en la traducción y degradación de mRNAs. Aunque estos dos tipos de moléculas pueden ser funcionalmente equivalentes, se distinguen por su proceso de biogénesis (**Figura 1.8**) [68-70].

Los RNAs interferentes pequeños (siRNAs), relevantes para este trabajo de tesis, se producen a partir de precursores de RNA de doble cadena

que pueden variar de tamaño y origen. Estos precursores son procesados por proteínas de la familia RNasa III: enzimas Dicer o Tipo-Dicer (DCL), que generan moléculas de doble cadena con una longitud aproximada de 22 nucleótidos.

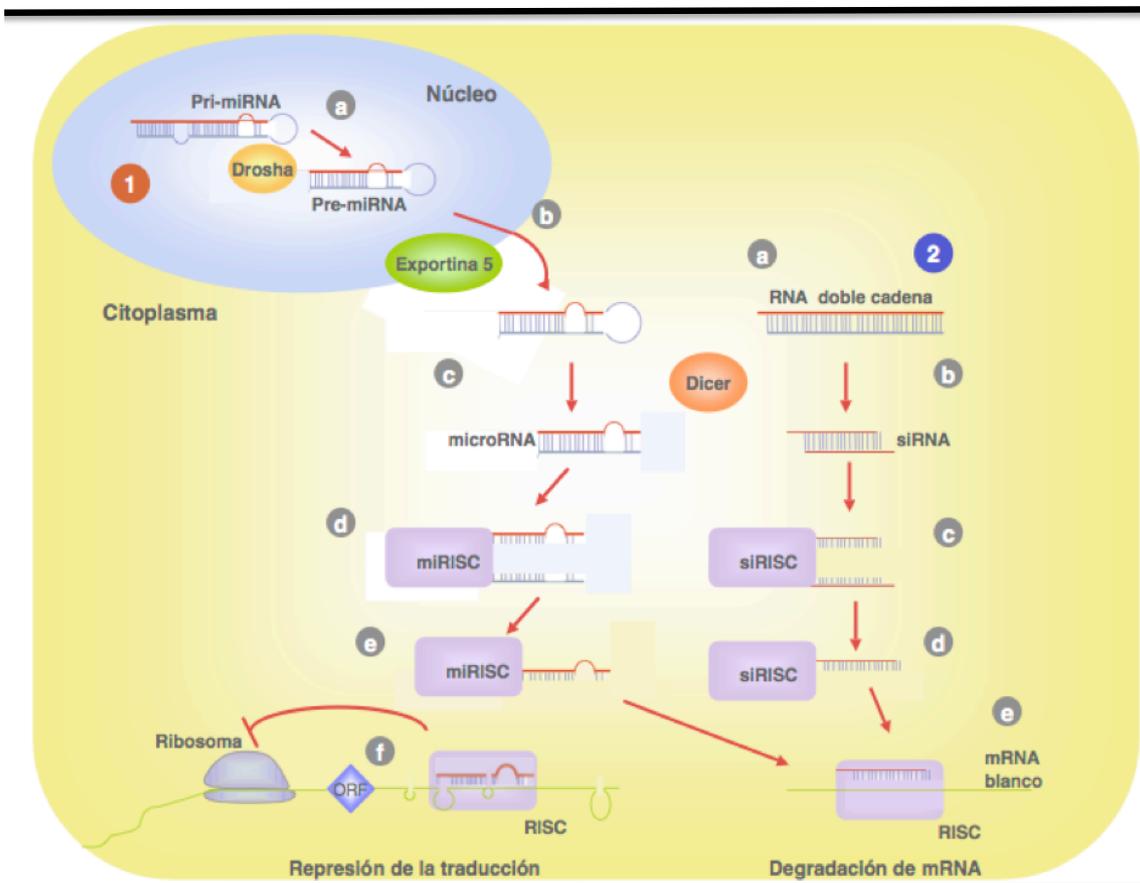


Figura 1.8. Vía del RNA de interferencia. Las dos vías de procesamiento son indicadas con los números 1 y 2. Los diferentes pasos que conforman cada vía se encuentran indicados con letras. 1. Biogénesis de microRNAs: a) Procesamiento por Droscha en el núcleo; b) Exporte de la molécula Pre-miRNA del núcleo al citoplasma por exportina 5; c) Segundo procesamiento por Dicer; d) Identificación y desnaturalización del microRNA por miRISC; e) Selección asimétrica de una de las cadenas del microRNA; f) Apareamiento con el mRNA blanco y represión de la traducción. 2. Biogénesis de los siRNAs: a) Presencia de un RNA de doble cadena en el citoplasma; b) Procesamiento por Dicer; c) Identificación del dúplex de 19-12 pb por siRISC; d) Selección asimétrica de una de las cadenas del dúplex; e) Apareamiento con el mRNA blanco y subsiguiente degradación.

Una vez generados, los siRNAs se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por RNA (siRISC), el cual está compuesto principalmente por proteínas de la familia Ago; la interacción del siRNA con siRISC provoca la desnaturalización del dúplex, generando dos cadenas sencillas; el siRISC selecciona una de las cadenas con base en las características termodinámicas que presente. La cadena de RNA retenida

actúa como “guía” en la identificación de los transcritos de mRNA por el siRISC. Una vez que este complejo encuentra a un mRNA que presente similitud con la cadena “guía”, la interacción siRNA/mRNA señala para que se corte el transcrito celular e inicia un proceso de degradación [68].

La posibilidad que ofrece el sistema de RNAi para inhibir la expresión específica de un gen hace posible utilizarlo como una herramienta poderosa en análisis genómico-funcionales. Recientemente se han desarrollado gran cantidad de bibliotecas de RNAi que van desde colecciones de oligonucleótidos hasta vectores multifuncionales, que han sido empleadas con éxito en la aplicación de RNAi a escala genómica. Este tipo de enfoque global se ha utilizado para el estudio de la interacción virus-célula hospedera en diversos virus, incluidos influenza, el virus de la inmunodeficiencia humana-1, dengue, hepatitis C, el virus herpes, el virus del síndrome respiratorio agudo severo, arenavirus, entre otros, y han derivado en listas de factores celulares con posible relevancia en la replicación viral [68, 71, 72].

En células en cultivo los rotavirus inducen alteraciones estructurales y funcionales en la célula hospedera; sin embargo, poco se sabe de los mecanismos moleculares en que se basa la respuesta celular a una infección viral. Un estudio sobre la variación en los niveles de expresión de genes celulares subsiguiente a la infección por rotavirus resultó en la identificación de 508 genes diferencialmente regulados; este análisis global describe un nuevo escenario en la respuesta celular a la infección por estos virus [3]. No obstante, con estos ensayos no podemos evaluar la funcionalidad de esos genes celulares en la infección.

Con base en los resultados obtenidos en el silenciamiento a gran escala en células de mamífero utilizando el sistema de RNAi, nuestro interés en este trabajo fue utilizar una biblioteca de siRNAs diseñada contra aproximadamente 23,000 genes de humano para identificar proteínas celulares necesarias en el ciclo replicativo de rotavirus. Este ensayo a gran escala nos permitiera estudiar la participación funcional de gran cantidad de proteínas celulares, y, a

diferencia de los análisis del transcriptoma, una relación directa entre vías celulares y eficiencia de replicación viral.

Hipótesis

El uso de una biblioteca de siRNAs diseñada para inhibir la expresión de la mayor parte de los genes de la célula hospedera permitirá identificar proteínas y vías celulares necesarias para la replicación de rotavirus.

Objetivos

- a) Desarrollar y optimizar un ensayo experimental que permita detectar cambios en la acumulación de proteínas de rotavirus durante el ciclo de replicación viral.
- b) Identificar, a través del uso de una biblioteca de siRNAs, genes celulares cuya disminución en su expresión generen un cambio significativo en la síntesis de proteínas de rotavirus.
- c) Identificar las vías celulares relevantes para la replicación viral.
- d) Evaluar individualmente el papel de los genes identificados en la replicación del virus.
- e) Caracterizar las proteínas celulares involucradas en la vía de entrada de rotavirus.

Materiales y Métodos

Células y virus. La línea celular MA104, proveniente de células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops*, así como la línea celular de fibroblastos murinos L929 se crecieron en medio mínimo esencial de Eagle Advanced (D-MEM) (GibcoBRL), suplementado con 4.5% y 10% de suero fetal bovino, respectivamente. Las células CaCo-2, derivadas de epitelio humano intestinal (clona C2Bb1), se crecieron en D-MEM de alta glucosa con 10% de suero fetal bovino y aminoácidos no esenciales. Las cepas de rotavirus RRV (rhesus rotavirus) y UK (rotavirus bovino) fueron donadas por Y. Hoshino (NIAID-NIH, Bethesda, MD). La mutante de RRV, Nar3, y sus revertantes, clonas 14 y 18 (rNar-14 y rNar13-18) se obtuvieron en nuestro laboratorio [73]. Las cepas humanas de rotavirus Wa y DS-1 se obtuvieron de H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford CA). Todas las cepas de rotavirus se propagaron en células MA104; los lisados se activaron con tripsina (10 µg/mL; GibcoBRL) por 30 min a 37 °C. La purificación de TLPs y DLPs de las cepas RRV y UK se hizo en gradientes de centrifugación isopícnica de CsCl [74]. El adenovirus aislado de humano serotipo 5 (Ad5) fue propagado en células HeLa y fue donado por Ramón González (UAEM, Cuernavaca, Morelos). La cepa de reovirus mamífero tipo 3 (ReoT3D) fue una donación de T. S. Dermody (Vanderbilt University, Nashville TN). ReoT3D fue propagado en células L929 y el título viral fue determinado en células MA104 [20].

Anticuerpos, plásmidos y reactivos Anticuerpos monoclonales (mAb) contra las proteínas virales VP5 (2G4) y VP7 (159) fueron donados por H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford CA). El suero policlonal de conejo contra las proteínas estructurales de rotavirus (anti-TLPs), contra la proteína no estructural NSP5 y contra partículas purificadas de reovirus se produjeron en nuestro laboratorio. El mAb específico para la proteína DBP de Adv5 fue donado por Ramón González (UAEM, Cuernavaca, Morelos). El mAb 6C4 anti-ácido lisobisfosfatídico (LBPA) fue comprado en Echelon.

Los anticuerpos primarios utilizados contra proteínas celulares se enlistan a continuación.

Tabla 2. Anticuerpos contra proteínas celulares utilizados para microscopía confocal

Gen	Empresa	Número de catálogo
ARF6	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	SC-7971
CDC42	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	SC-8481
EEA1	BD BIOSCIENCES	610457
RAB5A	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	SC-309
RAB7A	CELL SIGNALING TECHNOLOGIES	2094
RAB9A	GENE TEX	GTX22B10
RHOA	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	SC-418
TSG101	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	SC-7964

Los anticuerpos secundarios utilizados para ensayos de inmunofluorescencia fueron anti-conejo o anti-ratón acoplados a Alexa-Fluor-488, -568 o -647 (Molecular Probes) o IRDye 800 (LI-COR Biosciences). Para los ensayos de inmunoperoxidasa se utilizó un anticuerpo secundario hecho en cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (Perkin Elmer Life Sciences). Los plásmidos pCR3.1/YFP/Tsg101, pCR3.1/GFP/Tsg101/1–157, pCR3.1/ CFP/VPS4AA, pCR3.1/CFP/VPS4AAE228Q, pCR3.1/YFP/Alix, pCR3.1/YFP/Alix 176–869, y pCR3.1/CFP/HRS fueron donados por P. D. Bieniasz (Rockefeller University, New York). Los plásmidos RAB5Q79L, RAB5S534N, RAB7, y RAB7NI25I fueron donados por J. Gruenberg (University of Geneva). Los plásmidos que expresan a las GTPasas pequeñas CDC42, CDC42N17 y CDC42V12 fueron un regalo de F. Sánchez (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid). La transferrina marcada con Alexa 549 fue comprada de Molecular Probes. Para la detección de proteína total en el tamizaje de RNAi se utilizó Alexa Fluor 680-succinimidyl ester (Invitrogen) [83].

Western blot. Monocapas de células MA104 se lisaron con amortiguador de carga (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% b-mercaptoetanol), y subsecuentemente se hirvieron por 5 min y se analizaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. La electrotransferencia de proteínas se efectuó en una membrana immobilon-NC (Millipore) durante 1 h a 130 mA utilizando como amortiguador CAPS (N-

cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid) (10mM). La membrana se bloqueo con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS-0.1% tween 20 durante 1 hora con agitación constante, posteriormente se realizó la incubación de los anticuerpos primarios indicados diluidos en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Al final de la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-0.1% tween por 10 min. Se añadieron los anticuerpos secundarios especie específica acoplados a Alexa-647 o -568. La señal de inmunofluorescencia fue detectada en el scanner Typhoon Trio (General electric). Para la cuantificación y densitometría de las imágenes se utilizó el software ImageQuant.

Ensayos de infectividad por inmunofluorescencia. Monocapas de células MA104 se transfectaron con los plásmidos o siRNAs indicados y crecidas sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro. Después de 24-48 hpt (para los plásmidos) o 72 hpt (para siRNAs), las células se infectaron con rotavirus a una MOI de 3 por 1 h a 37°C o transfectadas con 500 ng de DLPs purificadas. Seis horas post infección, las monocapas se fijaron con paraformaldehido (Sigma) al 2% en PBS por 20 min y permeabilizadas con 0.5% de Tritón X-100 (Sigma), 1% de BSA (Sigma) en PBS y NH₄Cl 50 mM por 15 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en amortiguador (1% de BSA (Sigma) en PBS y NH₄Cl 50 mM) por 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS y NH₄Cl 50 mM. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-conejo acoplado a Alexa 568 (Molecular probes) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Por último, se efectuaron 4 lavados de 5 min con PBS y NH₄Cl 50 mM y se agregó DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio usando Fluokeep (Argene). Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioskop 2) acoplado a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ) y se efectuó la cuantificación de células infectadas tras los distintos tratamientos. Para los ensayos de transfección de siRNAs, la infectividad relativa se calculó normalizando la infectividad comparadas con células tratadas con un siRNA irrelevante dirigido contra la proteína celular GRP94. Para los ensayos de transfección de plásmidos, la infectividad se calculó cuantificando el número de

células infectadas de solamente aquellas que expresaban la proteína codificada en los plásmidos. La infectividad fue calculada normalizando el número de células infectadas en células expresando las dominantes negativas (DN) en relación a aquellas que expresaban su versión silvestre.

Determinación del rendimiento viral. El rendimiento de virus infeccioso producido en los diferentes experimentos se determinó de la siguiente manera: Las monocapas de células infectadas con el virus se lisaron por dos ciclos de congelamiento-descongelamiento y los lisados virales se trataron con 10 μ g de tripsina/mL por 20 min a 37°C. Posteriormente, monocapas de células MA104 en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con disolución salina amortiguada por fosfatos (PBS) y diluciones seriadas del lisado viral se incubaron con la monocapa celular por 60 min a 37°C. Después del periodo de adsorción, el inóculo viral se removió, las células se lavaron una vez con PBS, se añadió MEM y la infección procedió por 14 h a 37°C. Las células infectadas se detectaron por ensayos de inmunoperoxidasa usando un suero hiperinmune de conejo contra rotavirus (anti-TLPs) y el FFU se calculó utilizando Visiolab 1000 (Biocom), como se describió anteriormente [74].

Internalización de transferrina. Monocapas de MA104 se lavaron por duplicado con MEM. Posteriormente se agregaron 50 μ g/ml de transferrina por 1 h a 4°C. Al finalizar la incubación las células se lavaron y se adicionó medio a 37°C para permitir la entrada de la proteína por endocitosis. Con objetivo de eliminar la señal de transferrina unida a la superficie celular, las células se lavaron antes de ser fijadas con PBS a pH 5, seguido de otro lavado con PBS pH 7. Finalmente las células se procesaron para IF como se describió anteriormente [20].

Biblioteca de siRNAs. El ICCB (Institute of Chemistry and Cell Biology) forma parte de la Escuela Médica de Harvard y es una facilidad que posee la infraestructura necesaria para realizar análisis a gran escala utilizando una colección de moléculas pequeñas bibliotecas de siRNAs. La biblioteca de siRNAs (Dharmacon) está dirigida contra 21,181 genes humanos. El

silenciamiento de cada proteína es llevado a cabo en la modalidad de "SMART pool", donde una mezcla de 4 siRNAs diseñados contra diferentes lugares de cada gen se usa en una mezcla, generando un efecto sinérgico que se traduce en un mejor silenciamiento de la expresión del mRNA blanco.

Lipofección reversa de siRNAs. Una mezcla de oligofectamina (Invitrogen) en MEM sin suero se incubó a 37°C por un lapso de 10 min. Se añade a la mezcla 1 μ M del siRNA (Dharmacon) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. La mezcla es colocada en las cajas de cultivo correspondientes y se añaden células MA104 suspendidas en MEM Advance con 4.5% de suero fetal bovino como se describió anteriormente [20]. Después de 72 h post-transfección, las células son procesadas.

Ensayos In Cell Western (ICW). Monocapas de MA104 se fijaron con formaldehído (Sigma) al 4% en PBS por 20 min y permeabilizadas con 0.5% de Tritón X-100 (Sigma), 1% de BSA (Sigma) en PBS y NH₄Cl 50 mM, por 15 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en amortiguador (1% de BSA (Sigma) en PBS y NH₄Cl 50 mM) por 1 h a temperatura ambiente; para la identificación de la proteína VP4 se utilizó el anticuerpo primario monoclonal 2G4 y se incubó a 4°C O/N. Tras 4 lavados con PBS y NH₄Cl 50 mM, las monocapas se incubaron con el anticuerpo secundario RDye 800CW Anti-ratón IgG (LiCor Biosciences) y para la detección de proteína total se utilizó Alexa Fluor (680) ácido carboxílico, succinimidil ester (Invitrogen). Los microplatos se analizaron con el lector de inmunofluorescencia Aeries (Licor Biosciences) y la cuantificación de la señal fue realizada con el software Aeries Image systems.

RT-PCR en tiempo real. Monocapas de células MA104 se lisaron con TRIzol y el RNA total fue purificado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. 100 ng de RNA total fue utilizado como template y la amplificación de DNA fue realizada en la presencia de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (Applied Biosystems) Sybergreen PCR master mix utilizando el sistema de detección ABI Prism 700 (Applied Biosystems). La cadena negativa de RNA

viral fue amplificada utilizando oligonucleótidos diseñados contra el gen VP6 y NSP4. Para la amplificación de los múltiples genes celulares se utilizaron los oligonucleótidos mostrados en la siguiente tabla. Los cambios relativos de amplificación se normalizaron contra la amplificación del gen GAPDH. Las veces de aumento o disminución se calcularon utilizando el método de 2^{-Ct} [12, 75].

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la detección de mensajeros por RT-PCR en tiempo real

Gen	Sentido	Secuencia
ACTN4	+	ctgtaagggtgctggctgtca
ACTN4	-	ggatagtcttttggggcaca
ALIX	+	actctccccaaggagggtgtt
ALIX	-	ttctgctgcatgctgtaacc
ALIX	+	accagttccacgacatcctc
ALIX	-	tccatgttgctgctcttc
ARF1	+	accccgcttagcatagattt
ARF1	-	cacatggctatggaatgcag
ATP6V0C	+	tctggaagggtggaatggag
ATP6V0C	-	ttctccaacatcgtgagcag
ATP6V1B1	+	gatgattcagacgggcattt
ATP6V1B1	-	gcacagccttgactcttc
COPA	+	accacaagcaaccacatcaa
COPA	-	gggacgacactccctgtcta
COPB1	+	ggggatctgaaactgtgga
COPB1	-	ggaattctgcatcagtgcaa
HRS	+	ggtccaggacacctaccaga
HRS	-	agtggtgcttacgggtcatc
RAB2LA	+	gtgggcaaatccaaactcat
RAB2LA	-	gtcccaaaagtccacaagga
RAB30	+	cttagcatgccgactcatca
RAB30	-	gtaagctcaggagcccacag
RAB5C	+	tggacctccaggagaacaac
RAB5C	-	attccagtcgggtcattcag
VPS24	+	aagtcaggagctgaccagga
VPS24	-	ccagaggatctgggttgaa
VPS25	+	ggaggccatggttcagagta
VPS25	-	tgccaggagctcgtctattt
VPS37D	+	ccgccaggagtgttttcat
VPS37D	-	tcacctgcacaggtcagaag
VPS4A	+	cagaggaggacaaagccaag
VPS4A	-	tgccctcactctggttctct

Transfección de plásmidos. Los plásmidos se introdujeron a las células por transfección reversa. 200 ng de cada plásmido se mezclaron con lipofectamina LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA) y MEM directamente en una placa de 48 pozos.

Veinte min después, se agregaron células MA104 suspendidas en DMEM. Las células se incubaron por 24 o 48 h para su procesamiento [20].

Tratamiento con el anticuerpo Anti-LBPA. Células MA104 se preincubaron con 50 mg/mL del anticuerpo anti-LBPA o un anticuerpo control de isotipo IgG por 16 h a 37°C . Se infectaron con RRV, UK y Wa por 1 h a 4°C en ausencia de anticuerpo; las células se lavaron 2 veces y se incubaron 7 h a 37°C en medio MEM como se describió anteriormente [84].

Análisis de la entrada de rotavirus por microscopía confocal. Monocapas de células MA104 crecidas sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro se lavaron e incubaron con MEM sin suero por 30 min a 37 °C, posteriormente incubadas con 0.5% de BSA en PBS por 1 h a 4 °C. TLPs purificadas por CsCl se añadieron (MOI = 50) e incubaron por 1 h a 4 °C. El virus no unido fue removido lavando con MEM y posteriormente las células se incubaron a 37 °C. Las células se fijaron a los tiempos correspondientes y procesadas para IF. Se visualizó la co-localización de proteínas celulares y partículas virales usando un microscopio confocal Bio-Rad MRC acoplado a una cámara Axiophot (Zeiss) o usando un microscopio confocal Zeiss LSM 510. Cada co-localización se realizó por triplicado y cinco células seleccionadas al azar por cada tiempo se analizaron con el programa ImageJ 1.45S usando el plugin de co-localización. La detección de la señal correspondiente a partículas virales se realizó con un umbral dimensional de 0.03-1.3 μm^2 .

Análisis de enriquecimiento. La clasificación de genes en funciones biológicas se realizó utilizando el programa Ingenuity Systems disponible en línea (www.ingenuity.com). El enriquecimiento o sobre-representación del grupo de proteínas definidas como positivas en cada categoría, se hizo en relación a todo el conjunto de genes probados en el tamizaje de RNAi; lo anterior se calculó usando la herramienta estadística de valor P, que es calculado usando la distribución de probabilidad hipergenómica implementada en el lenguaje R.

Análisis estadístico. En los tamizajes realizados, los hits positivos se definieron como aquellos tratamientos que disminuyeron más del 25% de la tasa de intensidad de fluorescencia normalizada (la señal del mAB 2G4/la señal del Alexa 680-éster succinimidilico) contra la observada en los controles negativos, siRNA irrelevantes (Irr). Adicionalmente, que presentaran una SD (del inglés estándar deviation) de menos del 25% del total de la tasa de fluorescencia de los valores crudos. Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron usando una prueba t de Mann-Whitney con el programa GraphPad.

Resultados

1. Identificación de proteínas celulares importantes en el ciclo de replicación de rotavirus mediante RNAi.

Para este estudio utilizamos una biblioteca de siRNAs sintetizada por la compañía Dharmacon, dirigida contra aproximadamente 21,000 genes humanos. El uso de bibliotecas para ensayos de gran escala requiere un diseño experimental robusto y fiable; la optimización del ensayo de detección se realizó en formato de cajas con 384 pozos utilizando la prueba estadística **Z-score** o Z-factor; esta herramienta para el análisis de datos evalúa la dispersión que existe entre los datos generados por la repetición de un ensayo bajo las mismas condiciones experimentales [76].

$$Z' = 1 - \frac{(3SD_+ + 3SD_-)}{|Ave_+ - Ave_-|}$$

SD+ = Desviación estándar del control positivo

SD- = Desviación estándar del control negativo

Ave+ = Promedio del control positivo

Ave- = Promedio del control negativo

Desarrollamos un diseño experimental que permite evaluar cambios en la acumulación de una proteína viral, con objetivo de cuantificar alteraciones del ciclo de replicación de rotavirus en células tratadas con distintos siRNAs [77] (Anexo 1) (**Figura 2.1**). El ensayo consistió en un tamizaje primario seguido por un secundario. En el tamizaje primario lipofectamos la biblioteca de siRNAs en células MA104, susceptibles a la infección por rotavirus, en cajas de cultivo de 384 pozos. Cada tratamiento representaba una mezcla equimolar de 4 diseños de siRNAs dirigidos contra un gen celular. A las 72 h post-transfección, una vez que los siRNAs se han incorporado a la maquinaria de silenciamiento de la célula hospedera, las monocapas celulares se infectaron con la cepa RRV de rotavirus; después de 10 horas post-infección la acumulación de la proteína viral VP5 se detectó con un anticuerpo monoclonal

y la proteína total en cada pozo de la placa se cuantificó midiendo la interacción del fluoróforo Alexa 680-éster succinimidílico, el cual interacciona con lisinas. A este tipo de ensayo le llamamos In Cell Western Blot.

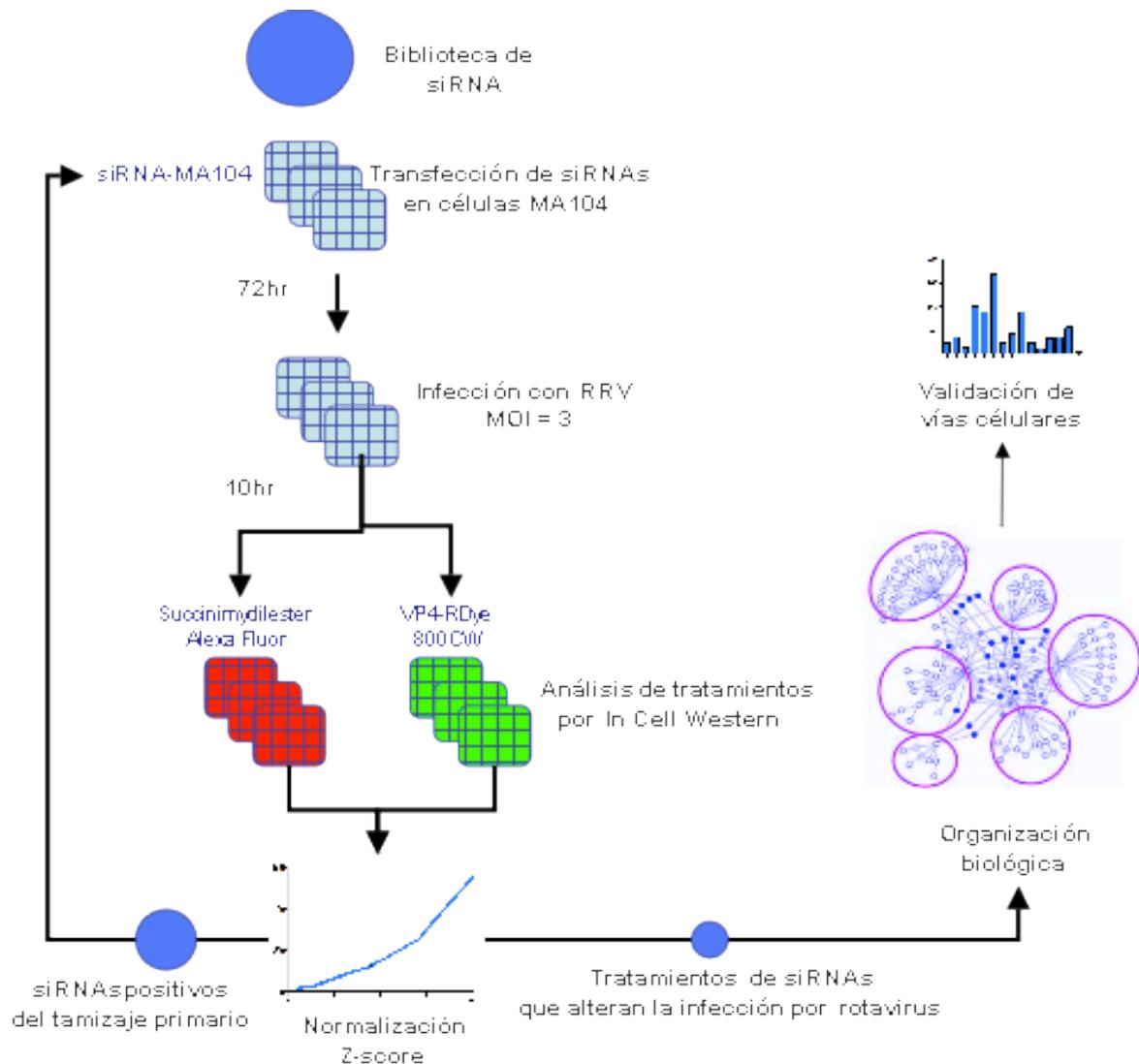


Figura 2.1. Diseño experimental para el uso de una biblioteca de siRNAs en la identificación de proteínas celulares importantes para rotavirus. Se realizó un tamizaje primario en el que se empleó la biblioteca de siRNAs en su totalidad; una vez definidos los tratamientos positivos de este ensayo, se comprobaron estos datos en un tamizaje secundario. Una vez definidas aquellas proteínas importantes para la infección por rotavirus, se realizó su categorización biológica.

Para este ensayo en gran escala, el efecto de los siRNAs en la infección por rotavirus se evaluó analizando la acumulación de la proteína viral VP5 (identificada con el anticuerpo policlonal 2G4) en relación con la proteína total de cada ensayo de silenciamiento. La eficiencia de la infección viral se definió de la siguiente forma:

$$\text{Eficiencia de infección} = \text{Proteína viral} / \text{Proteína total}$$

Cada uno de estos cocientes se normalizó contra la eficiencia de infección generada por un siRNA utilizado como control negativo (siRNA dirigido contra la proteína celular GRP94, el cual se ha reportado que no tiene efecto en el ciclo replicativo de rotavirus [78]), con el fin de cuantificar el grado de aumento o disminución en la síntesis de la proteína viral en relación a una infección normal (**Figura 2.1**). Mientras que el cociente nos define el fenotipo de infección generado por cada tratamiento de siRNA, la normalización determina la consistencia de estos datos en el conjunto de repeticiones de cada ensayo.

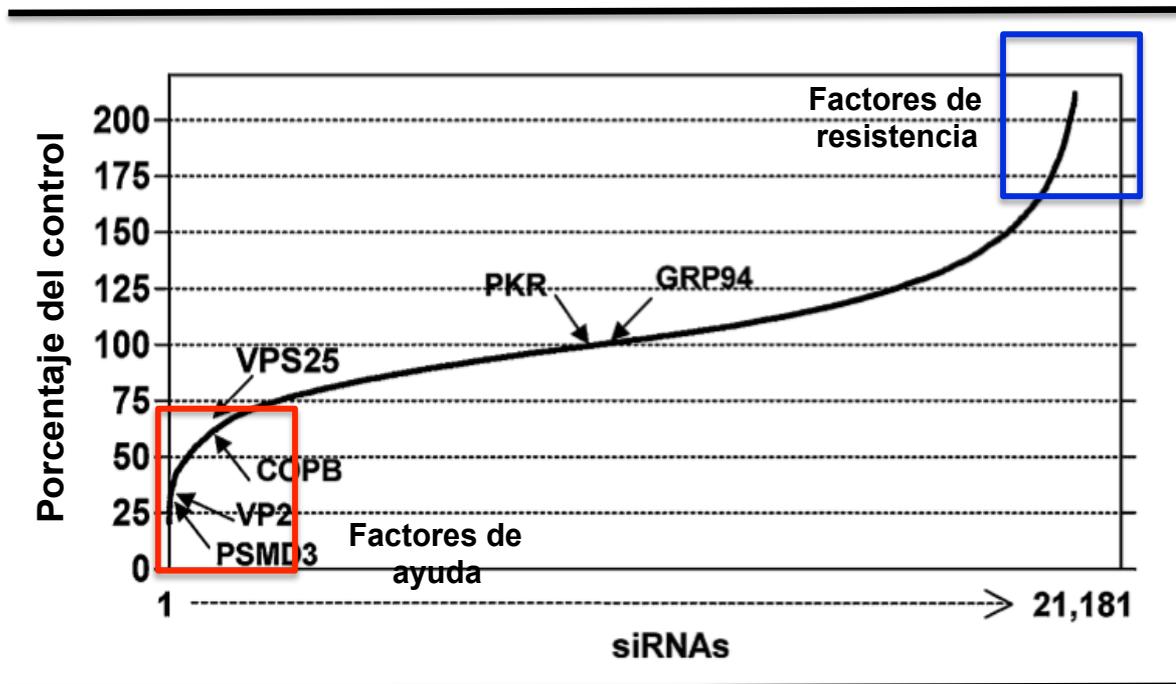


Figura 2.2. Tratamientos de siRNAs que aumentan o disminuyen la expresión de la proteína viral. Selección de genes de interés con base en el efecto del tratamiento de los siRNAs de la biblioteca Dharmacon en la expresión de la proteína viral.

Tras cuantificar la síntesis de VP5 y la proteína total en cada tratamiento, se identificó el porcentaje de infección viral en cada caso. Como se observa en la **Figura 2.2**, la mayoría de los tratamientos no generó un cambio estadísticamente significativo en la infección; sin embargo, logramos identificar dos fenotipos importantes que nos permitieron agrupar los tratamientos positivos en dos grupos. El primero, enmarcado en azul, son aquellos tratamientos con siRNAs que generan un aumento significativo en la infectividad de rotavirus. Este grupo de proteínas celulares, denominado *Factores Celulares de Resistencia*, representa potencialmente a aquellas proteínas que ejercen una función limitante en el ciclo replicativo de rotavirus. En contraste, aquellos tratamientos que generaron una disminución en la infectividad por rotavirus, definen a aquellas proteínas celulares que el virus requiere para llevar a cabo de manera eficiente su ciclo de replicación y se denominaron *Factores Celulares de Ayuda*.

Seleccionamos más de 700 siRNAs con fenotipo positivo en el tamizaje primario (**Tabla 4**). Evaluamos la consistencia de estos resultados en un tamizaje secundario: lipofectamos los siRNAs positivos en células MA104 y evaluamos su efecto en la síntesis de la proteína viral VP5. Para este tamizaje los 4 diseños de siRNAs se evaluaron de forma individual con fin de descartar falsos positivos. Confirmamos el efecto de 522 siRNAs (**Tabla 5**); optamos por aquellas proteínas que tras su silenciamiento generaban una disminución en la síntesis de proteína viral, además de presentar consistencia de este resultado con 2 ó más diseños de siRNA del gen en cuestión.

2. Clasificación de la función molecular y vías celulares en las que participan los genes definidos como importantes en la infección de rotavirus

El set de datos se analizó utilizando los programas Ingenuity y PANTHER para agruparlos y clasificarlos con base a su función biológica. Se clasificaron, con al menos un gen, en 183 funciones biológicas (**Figura 2.3, Tabla 6**). Para

definir el enriquecimiento estadísticamente significativo de nuestra lista de genes (522 genes) en funciones celulares, se utilizó la hipótesis estadística P-Value. Se analizó la presencia relativa de los genes positivos en referencia a todos los genes del genoma humano. Así, se dio más importancia a aquellos grupos de genes que, sin ser los más numerosos, tuvieron una proporción representativamente mayor en la muestra total en relación a aquellos genes que corresponden a la misma función molecular/biológica de todo el genoma humano.

El análisis demostró la participación de estos genes en una gran cantidad de funciones celulares, sugiriendo varias vías biológicas que pudieran estar implicadas en la infección por rotavirus. En nuestro grupo de blancos positivos que disminuyeron la síntesis de proteínas virales logramos identificar varias proteínas y procesos biológicos anteriormente definidos como relevantes en la infección del virus (**Figura 2.3, Tabla 6**). Algunos ejemplos sobresalientes son los siguientes:

- a. Integrinas y componentes necesarios en su señalización; estas proteínas se han descrito como importantes en la entrada del virus a la célula hospedero [18, 19, 21, 22].
- b. Miembros del complejo COPI (COPA, COPB y ARF1), necesarios en tráfico intracelular requerido para el ensamble del virión maduro [79].
- c. Componentes de la vía de señalización por calcio. Se ha descrito que la infección de rotavirus modifica la homeostasis de Ca^{2+} , efecto generado por la proteína glicosilada, NSP4 [80, 81].

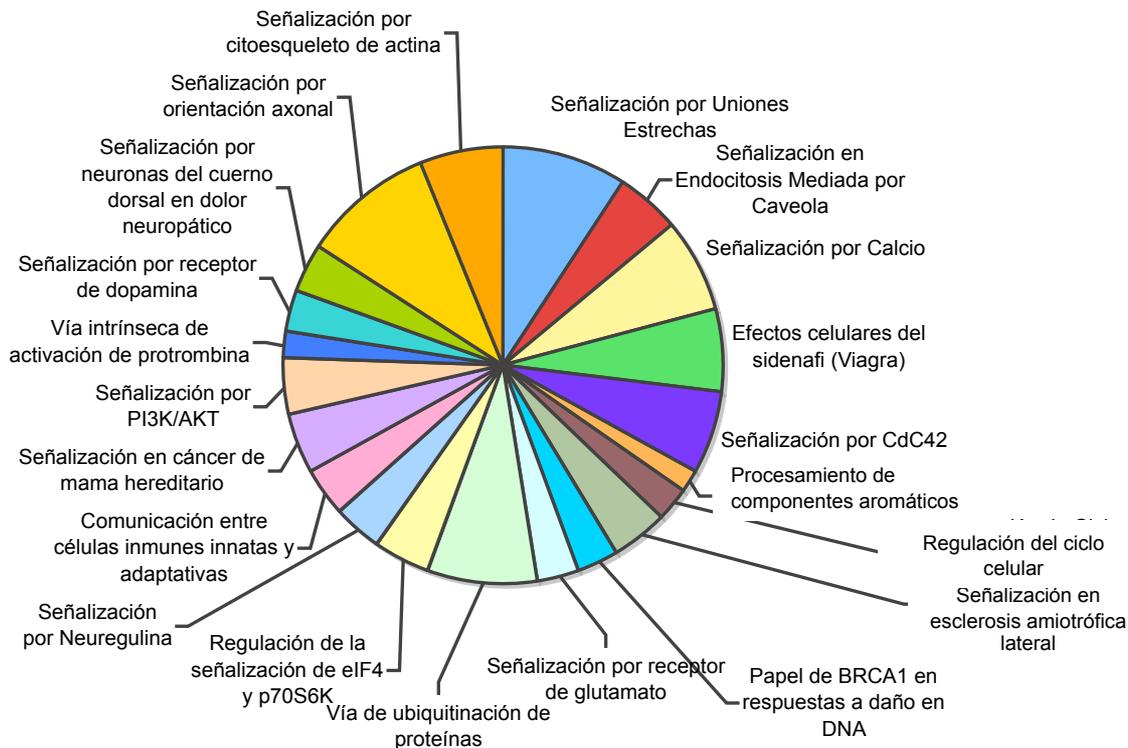


Figura 2.3. Organización en vías celulares del grupo de proteínas importantes para la replicación de rotavirus. Categorización biológica de las proteínas que resultaron importantes para la infección de rotavirus en el tamizaje por siRNAs. Se utilizaron los programas Ingenuity pathways Panther, DAVID, GO annotation y STRING para los análisis de sistemas biológicos.

Tabla 6. Análisis estadístico del enriquecimiento de procesos celulares en nuestro grupo de datos positivos.

Vías	$-\log(p\text{-value})$	Moléculas
Señalización por Uniones Estrechas	4.26E+00	15
Señalización en Endocitosis Mediada por Caveola	3.19E+00	8
Señalización por Calcio	2.24E+00	11
Efectos celulares del sildenafil (Viagra)	2.15E+00	10
Señalización por CdC42	2.11E+00	10
Procesamiento de componentes aromáticos	1.91E+00	3
Regulación de Ciclo celular por proteínas de la familia BTG	1.91E+00	4
Señalización en esclerosis amiotrófica lateral	1.84E+00	7
Papel de BRCA1 en respuestas a daño en DNA	1.83E+00	5
Señalización por receptor de glutamato	1.80E+00	5
Vía de ubiquitinación de proteínas	1.73E+00	13

Lo anterior confirma que algunos de los datos obtenidos en el tamizaje son consistentes con resultados previamente descritos para rotavirus, además

valida la posibilidad de identificar proteínas importantes en el ciclo replicativo del virus antes no descritas por medio de análisis genómicos funcionales utilizando librerías de siRNA. Así, se identificaron nuevas vías celulares en nuestro grupo de datos (**Figura 2.3, Tabla 6**). Definimos el grado de enriquecimiento de estas vías celulares con base en su valor P; encontramos 21 vías celulares con un enriquecimiento estadísticamente significativo en nuestro grupo de positivos. Del amplio grupo de procesos biológicos que resultaron importantes en la infección de rotavirus, se caracterizaron en mayor detalle las siguientes vías: uniones estrechas, vía ubiquitinación-proteosoma y vía endocítica. Estas vías se seleccionaron con base en los altos valores P obtenidos, además de ser vías celulares involucradas en procesos en los que el laboratorio tiene interés. El inicio de la caracterización de estos genes involucrados en la infección por rotavirus, inició con la evaluación de la interferencia en la expresión de los genes celulares, generada por los tratamientos con siRNAs; una vez confirmado el efecto de cada uno de estos siRNAs, ya sea por RT-PCR o Western blot (datos no mostrados), se continuó con una caracterización profunda en la participación de estas proteínas en el ciclo replicativo de rotavirus.

3. Validación y caracterización de procesos biológicos necesarios en la infección por rotavirus.

3.1 Vía de uniones estrechas

Catorce proteínas pertenecientes a la red relacionada con las uniones estrechas resultaron positivas en el tamizaje de siRNAs. Se identificaron cuatro proteínas transmembranales: tres claudinas (CLDN14, CLDN9, CLDN16) y la inmunoglobulina JAM-A (F11R); por otro lado, se encontraron 10 proteínas pertenecientes a la placa citoplásmica de las UE o a los procesos de señalización en la formación de UE (PARD6A, PPP2R1B, MYH1, PPP2R5C, PRKCZ, MYL9, MYH8, CNKSR3, LLGL1, PTEN).

Para comprobar la relevancia de esta vía celular en la infección de rotavirus, examinamos el efecto de siRNAs diseñados para silenciar los genes que codifican para estas proteínas. En consistencia con los resultados del tamizaje, comprobamos el efecto de más del 90% de los tratamientos con los distintos siRNAs (**Figura 2.4**).

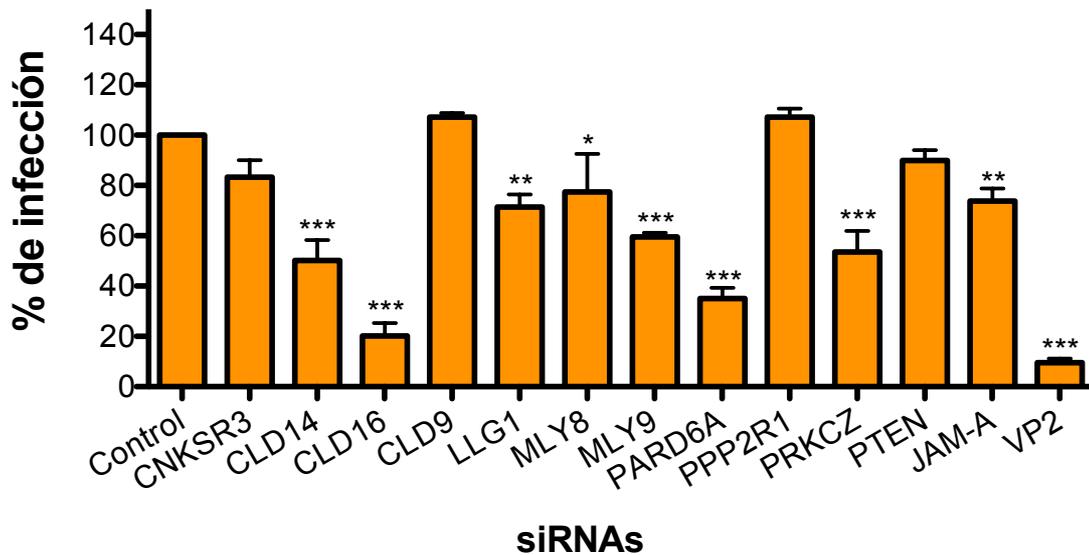


Figura 2.4. Silenciamiento de componentes de uniones estrechas. Células transfectadas con distintos siRNAs se infectaron 72 horas post-transfección con la cepa RRV de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia. Los ensayos se normalizaron contra células transfectadas con un siRNA irrelevante en la infección por rotavirus, siGRP94.

Adicionalmente, efectuamos un ensayo de transfección de DLPs; estas partículas son transcripcionalmente activas y pueden iniciar el ciclo replicativo de rotavirus una vez situadas en el citosol, escapando de los procesos de unión y entrada a la célula hospedera característicos de un virión maduro o TLPs de rotavirus. Los tratamientos con siRNA que afectaran la replicación viral en células transfectadas con DLPs, serían aquellos que inhiben un paso posterior al proceso de entrada. Ninguno de los tratamientos con siRNAs (**Figura 2.5**) generó una disminución en la infectividad del virus, lo que sugería que el efecto de disminución de la infectividad observado en una infección típica por RRV utilizando siRNAs en contra de estas proteínas, está relacionado con procesos de unión y/o entrada del virus a la célula.

Fue de particular interés encontrar a la proteína JAM-A (del inglés Junctional adhesion molecule A) como relevante en la infección de rotavirus; JAM-A es el principal receptor para reovirus, otro miembro de la familia *Reoviridae* [65]. Con fin de demostrar el efecto de esta proteína en la entrada del virus realizamos ensayos de bloqueo con un péptido diseñados contra la parte extracelular de JAM-A (280-286 aa), sitio de unión descrito para reovirus [82].

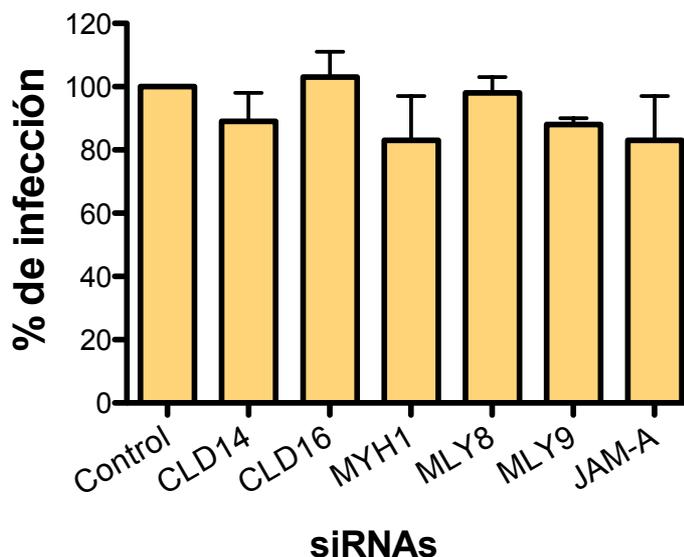


Figura 2.5. Silenciamiento de componentes de uniones estrechas y transfección de DLPS. El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un siRNA irrelevante en la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α TLPs.

A 10 μ g/ml se obtuvo una disminución significativa en la infectividad del virus en las tres condiciones probadas: a) incubación paralela del péptido con virus/célula, b) incubación con célula, c) incubación con virus (**Figura 9**). La incubación del péptido con el virus pareciera tener más efecto en la disminución de la infectividad a comparación de tratamientos donde solamente las células son incubadas. Asimismo, el efecto de ambos tratamientos

pareciera ser aditivo, como se observa en tratamientos paralelos de células y virus incubados con el péptido.

El ensayo de bloqueo también se realizó infectando con cuatro cepas diferentes de rotavirus (**Figura 2.7**). Con excepción de la cepa YM, todos los tratamientos resultaron en una disminución significativa en la infectividad del virus. Como control negativo del tratamiento se utilizó al virus SV40, el cual se sabe no requiere de los componentes de las uniones estrechas, específicamente de la proteína JAM-A, en su ciclo infectivo.

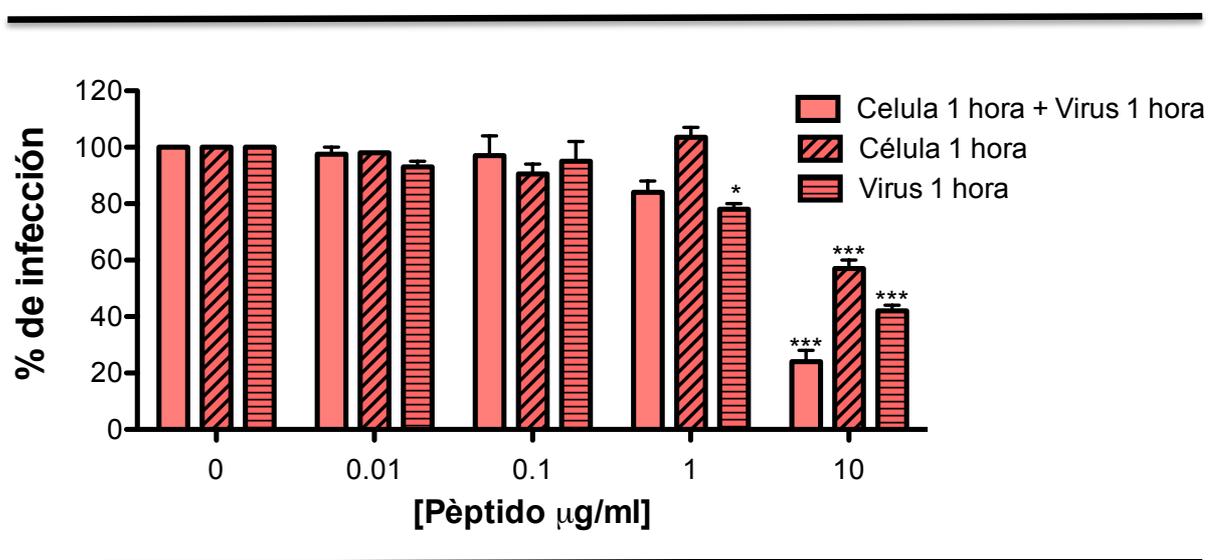


Figura 2.6. Ensayos de bloqueo de la infección usando un péptido anti-JAM-A. El péptido α -JAM-A conocido por bloquear el dominio citoplásmico de la proteína transmembranal JAM-A, se incubó a distintas concentraciones por 1 hora a 4°C con células MA104, la cepa RRV de rotavirus o ambos. Posteriormente, las células se incubaron con el virus por 1 hora a 4°C (MOI=3), el virus se removió con medio a 37°C y la infección se dejó avanzar hasta 6 horas. Los tratamientos se fijaron y procesaron para un ensayo de inmunofluorescencia donde se cuantificó la presencia de proteína viral utilizando en anticuerpo policlonal α TLPs. Los datos se normalizaron contra el control, correspondiente a tratamientos donde la concentración de péptido es 0 µg/ml.

Estos resultados sugieren que el bloqueo de la unión virus-JAM_A afecta la eficiencia de la infectividad de rotavirus. Es necesaria una caracterización más exhaustiva para determinar si esta proteína celular participa estrictamente como receptor de la cepa RRV en células MA104 y si la estructura funcional de uniones estrechas es necesaria en esta interacción. El estudio de las uniones

estrechas en un contexto de infección viral, es actualmente abordado por el estudiante de doctorado Jesús Torres Flores; los resultados sugieren que la participación de JAM-A y Ocludina en la infección por rotavirus es a nivel de entrada (Torres-Flores, JM; Silva-Ayala, D; et. al. Manuscrito en preparación).

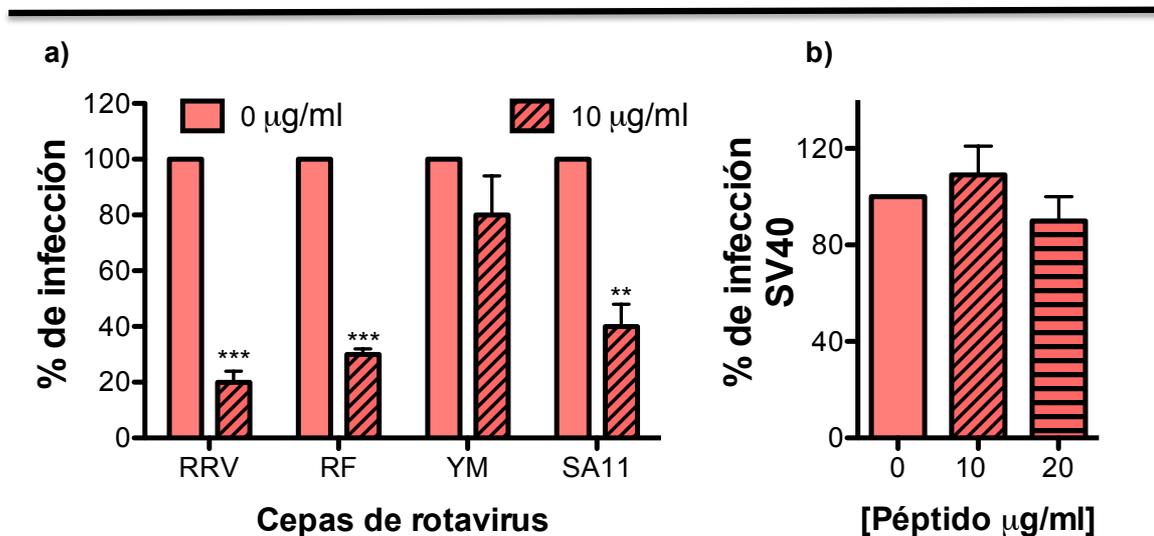


Figura 2.7. Ensayos de bloqueo de la infección usando un péptido anti-JAM-A. El péptido α -JAM-A se incubó a distintas concentraciones por una hora a 4°C con células MA104. Posteriormente, las células se incubaron con los virus por una hora a 4°C (MOI=3) e incubados por 6 horas (cepas de rotavirus) o 16 horas (SV40) para posteriormente ser procesadas para ensayos de inmunofluorescencia.

3.2 Vía de ubiquitinación-proteosoma

Se encontró un enriquecimiento particular de la vía de degradación proteasomal dirigida por ubiquitinación; encontramos 13 proteínas correspondientes a esta categoría, (PAN2, BIRC2, SMURF2, PSMD14, HLA-B, PSMD12, PSMD2, PSMB2, PSMD8, HECT3, CUL3, CUL7, SMURF), cuatro de ellas componentes no catalíticos de la subunidad 26S del proteasoma.

En la vía de ubiquitinación-proteasoma las proteínas destinadas a degradarse son covalentemente modificadas por ubiquitina y subsecuentemente degradadas por el proteasoma. Siguiendo la caracterización de las vías celulares que resultaron importantes para rotavirus en el tamizaje por siRNAs, analizamos nuevamente el efecto de los siRNAs

contra componentes del 26S del proteasoma (PSMD8, PSMD14, PSMD2), así como de otras proteínas celulares con función de E3 ligasa que resultaron positivas en el tamizaje (HEC3, CUL3, CUL7, SMURF2). Todas las subunidades del proteasoma disminuyeron significativamente la infectividad de rotavirus; sin embargo, la disminución de la expresión de estas proteínas disminuyó considerablemente la expresión de la proteína celular total. En contraste, de acuerdo al ensayo de detección de proteína viral los siRNAs contra CUL7, SMURF2 y HERC3 no redujeron significativamente la infectividad de la cepa RRV (Figura 2.8a).

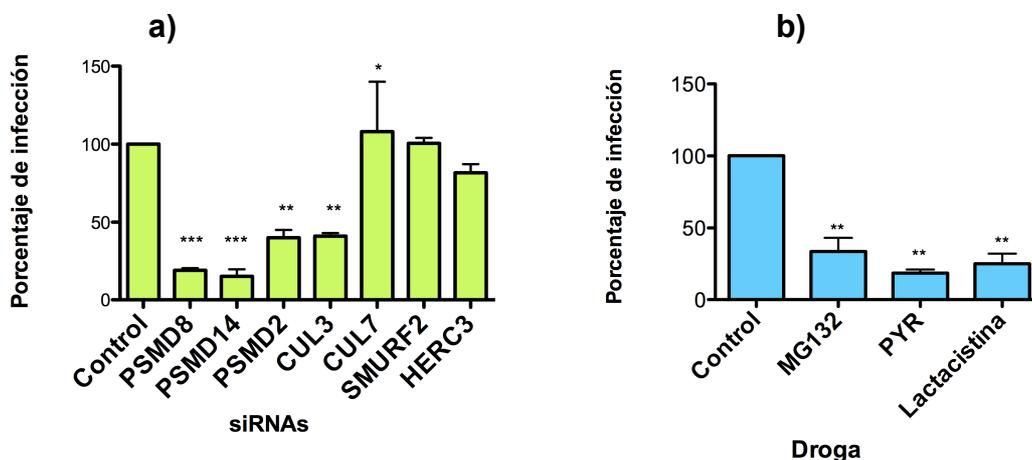


Figura 2.8. La vía de ubiquitinación-proteasoma es importante en la infección de rotavirus. **a)** Células tratadas con distintos siRNAs se infectaron después de 72 h de incubación, con la cepa RRV de rotavirus (MOI=3). **b)** Células tratadas con las drogas MG132 (10 μ M), lactacistina (7.5 μ M) y el inhibidor de proteasoma I (20 μ M) se infectaron con la cepa RRV de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con siRNA irrelevante en la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α TLPs.

Conjuntamente, con fin de comprobar la importancia de esta vía en la infección por rotavirus, decidimos utilizar moléculas pequeñas descritas como inhibidores de este proceso celular y evaluar el fenotipo ante una infección viral. MG132, PI (Proteasome Inhibitor I) y lactacistina son inhibidores de la actividad del proteasoma, y por consecuencia reducen la degradación de proteínas conjugadas con ubiquitina. Observamos una disminución significativa en la eficiencia del ciclo replicativo de la cepa RRV de rotavirus en células tratadas con los distintos inhibidores a concentraciones en donde la viabilidad celular no se ve afectada [83] (Figura 2.8b).

Estos resultados confirman la importancia de la vía de ubiquitinación y proteasoma en la eficiencia de la infección por rotavirus. En nuestro laboratorio se inició recientemente la caracterización de esta vía en el contexto de una infección viral y se ha logrado determinar la participación de esta vía celular en la replicación del genoma viral (Anexo 2) [83].

3.3 Vía de endocitosis

Resultados recientes en nuestro laboratorio indican que la vía endocítica celular es la forma en que rotavirus entra al espacio citosólico de la célula hospedera [20].

En consistencia con esos resultados, se encontraron 15 proteínas relacionadas con esta vía celular. Algunas de estas proteínas fueron subunidades de la H⁺ ATPasa vacuolar (V0 subunidad c y V1 subunidad B1), miembros de la vía ESCRT (VPS25 y VPS37D), sintaxina 6, GTPasas (RAB30, RABL2A, ARF1) y el receptor manosa-6-fosfato dependiente de catión. Aunado a esto, el marcador de endosomas tempranos EEA1, la GTPasa CDC42, así como su activador CDCGAP, se definieron como positivos en el tamizaje.

Simultáneamente, efectuamos un ensayo de transfección de DLPs. Los tratamientos con siRNA que afectaran la replicación viral en células transfectadas con DLPs serían aquellos que inhiben un paso posterior al proceso de entrada.

Encontramos que los tratamientos que silenciaban proteínas pertenecientes al complejo COPI (**Figura 2.9a**) alteran procesos subsecuentes a la entrada del virus; por otro lado, tratamientos contra subunidades de la ATPasa vacuolar, algunas RabGTPasas y componentes de la maquinaria ESCRT (complejos –I y –II) tienen un efecto exclusivo en la entrada del virus,

ya que los respectivos siRNAs no generaron una disminución en la infectividad de DLPs transfectadas, en contraste a una infección con TLPs (**Figura 2.9b-d**).

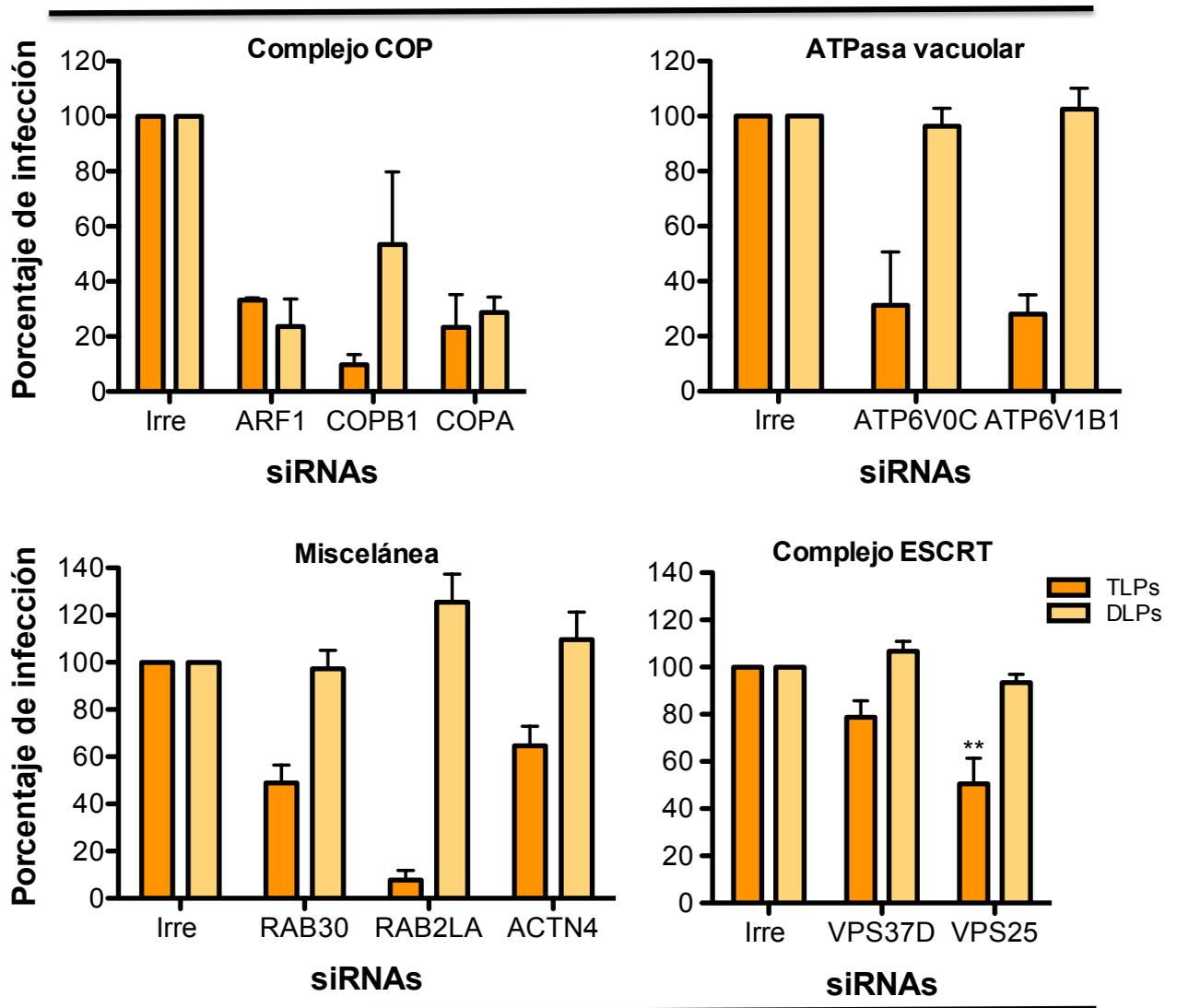


Figura 2.9. Validación de proteínas de la vía de endocitosis que resultaron importantes para rotavirus en el tamizaje de siRNAs. Células tratadas con los siRNAs indicados; después de 72 horas de incubación, se infectaron con la cepa RRV de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un siRNA irrelevante para la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

Papel del complejo ESCRT en la entrada de rotavirus

La presencia de componentes de la maquinaria de ESCRT fue de particular interés en el seguimiento de la caracterización de la vía de entrada del virus, debido a que la participación de este complejo en procesos de entrada del virus a su célula hospedera ha sido poco caracterizada.

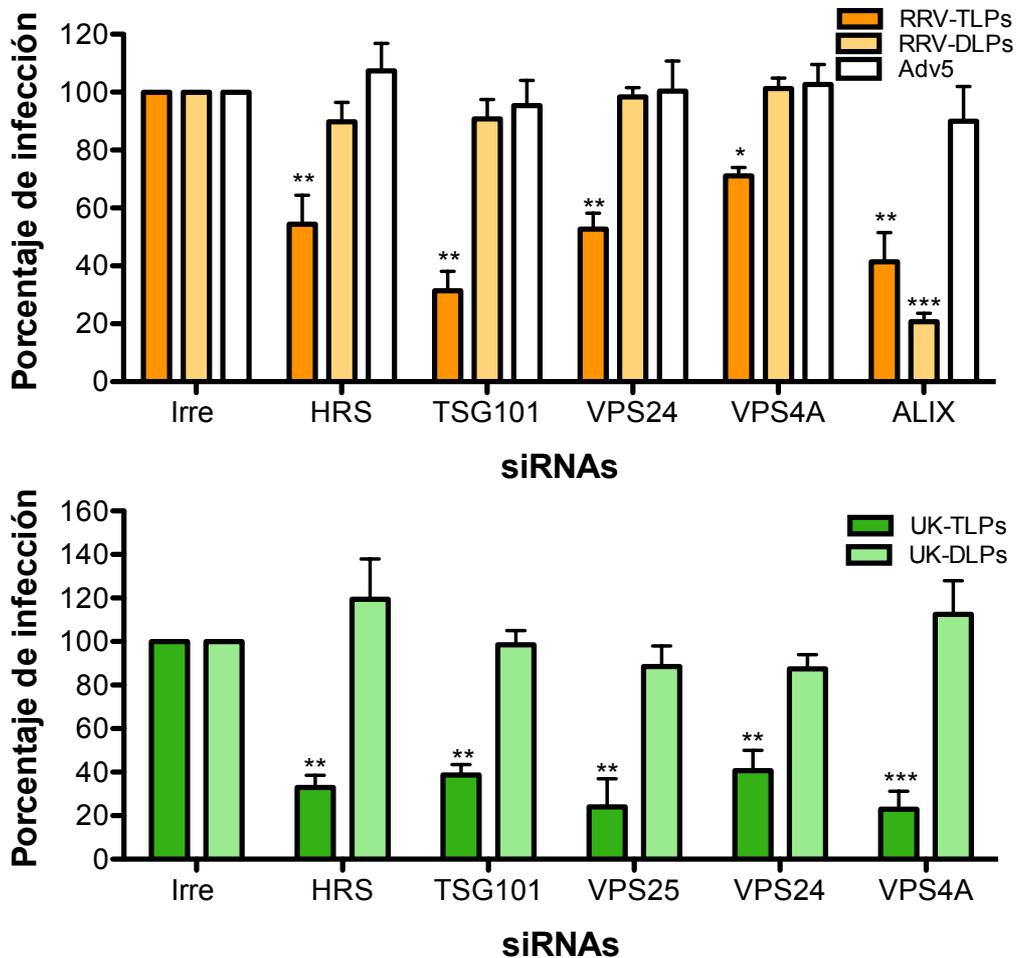


Figura 2.10. Los complejos de ESCRT son importantes en la entrada de rotavirus. Células tratadas con los siRNAs indicados; después de 72 horas de incubación, se infectaron con las cepa RRV (a) o UK (b) de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un siRNA irrelevante para la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

Decidimos entonces utilizar siRNAs contra otros componentes de esta maquinaria, en adición a los anteriormente confirmados, con fin de demostrar la participación de los complejos ESCRT -0 y -III de esta vía en el proceso de entrada de rotavirus. Los tratamientos con siRNAs que disminuyen la expresión de las proteínas HRS (ESCRT-0); TSG101 (-I); VPS24 y VPS4A (-III); y ALIX

(proteína accesoria al complejo ESCRT) generaron una reducción significativa en la infectividad del virus, además de no tener un efecto en la infectividad de DLPs transfectadas.

Por otro lado, el siRNA contra ALIX fue el único que provocó una disminución en la infectividad de las DLPs, sugiriendo que esta proteína participa en fases del ciclo replicativo de rotavirus posteriores a la entrada, aunque no excluye la posibilidad de que también esté involucrada en el ingreso del virus a la célula (**Figura 2.10a**).

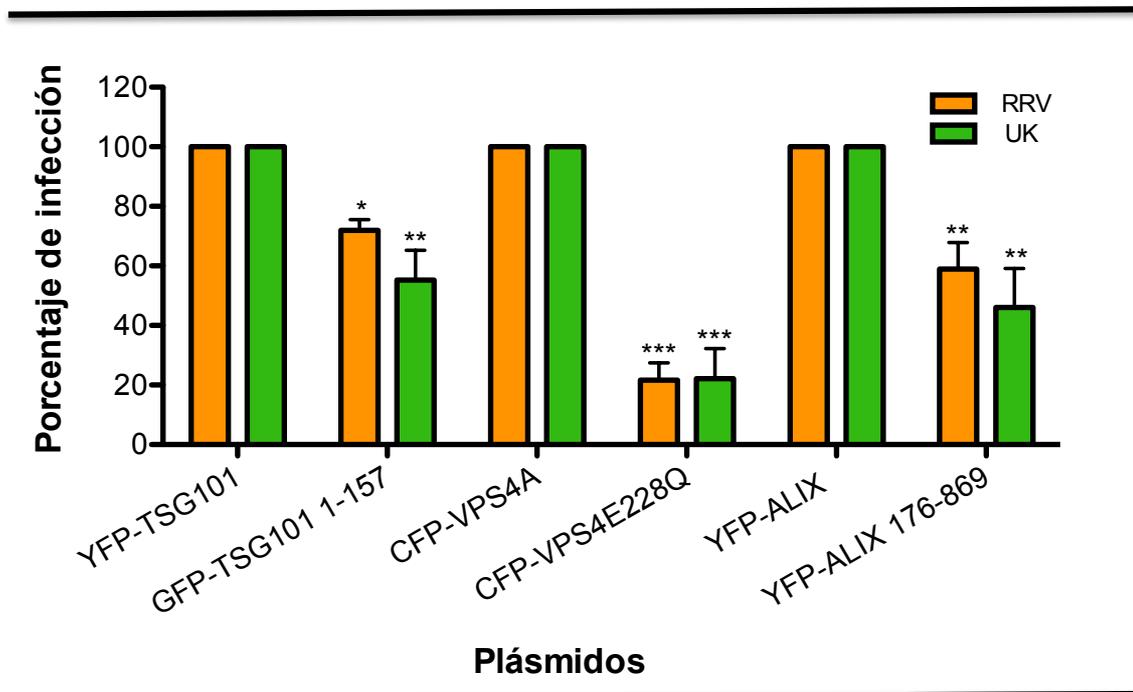


Figura 2.11. Los complejos de ESCRT son importantes en la entrada de rotavirus. Células transfectadas con los plásmidos indicados; después de 24 horas de incubación, se infectaron con las cepa RRV (a) o UK (b) de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un plásmido que expresaba la versión silvestre de cada dominante negativa. La detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

Otra de las cepas de rotavirus que ha sido ampliamente caracterizada, además de RRV, es la cepa de rotavirus UK, de origen bovino. De particular relevancia para este trabajo, se ha definido que el rotavirus UK no comparte

varios de los requerimientos definidos como importantes para la entrada de RRV.

Así, en contraste con RRV, la unión de UK a la célula no depende de ácidos siálicos (SA) externos. Aunado a lo anterior, para entrar a la célula la cepa UK utiliza una vía dependiente de clatrina, mientras que la cepa RRV usa una vía endocítica diferente [20]. Considerando las diferencias en los procesos de entrada que estas cepas presentan, decidimos estudiar la posible participación de ESCRT en el proceso de entrada de UK. Al igual que en el caso de RRV, el tratamiento con siRNAs contra las proteínas de ESCRT HRS, TSG101, VPS25, VPS24 y VPS4A, generaron una disminución importante en la productividad de la infección por UK (**Figura 2.10b**). Para estos ensayos, utilizamos como control negativo a células tratadas con los distintos siRNAs contra ESCRT infectadas con el adenovirus (Adv5), el cual se sabe no requiere a ningún componente de la maquinaria de ESCRT en su ciclo replicativo (**Figura 2.10a**).

Para corroborar la importancia de los componentes de ESCRT observado por ensayos de siRNA, células que expresaban a dominantes negativas de las proteínas TSG101, VPS4A y ALIX se infectaron con las cepas RRV y UK de rotavirus. Se observó una disminución significativa en la infectividad de ambos rotavirus en células que expresaban las DN TSG101, VPS4A y ALIX, no así con sus contrapartes silvestres (**Figura 2.11**).

Estos resultados demuestran que dos cepas de rotavirus que, aunque presentan eventos tempranos de entrada diferenciales, convergen en el requerimiento de un complejo ESCRT funcional para lograr un ciclo replicativo eficiente. Con el objetivo de analizar la participación de esta vía en los procesos infecciosos de cepas humanas del virus, decidimos evaluar el efecto de siRNAs en la infectividad de las cepas Wa y DS-1. Ambas cepas, al igual que UK, ingresan a la célula por endocitosis mediada por clatrina [20, 36]. Además del uso de cepas de rotavirus de origen humano, el silenciamiento de los componentes de ESCRT se realizó en el modelo prototipo de célula

hospedera, MA104, y en células de epitelio humano CaCo-2. La caracterización de la participación de la maquinaria de ESCRT en el proceso de entrada de estas cepas a células de distintos orígenes, nos permitiría ampliar nuestra observación más allá del sistema originalmente evaluado: rotavirus RRV-células MA104.

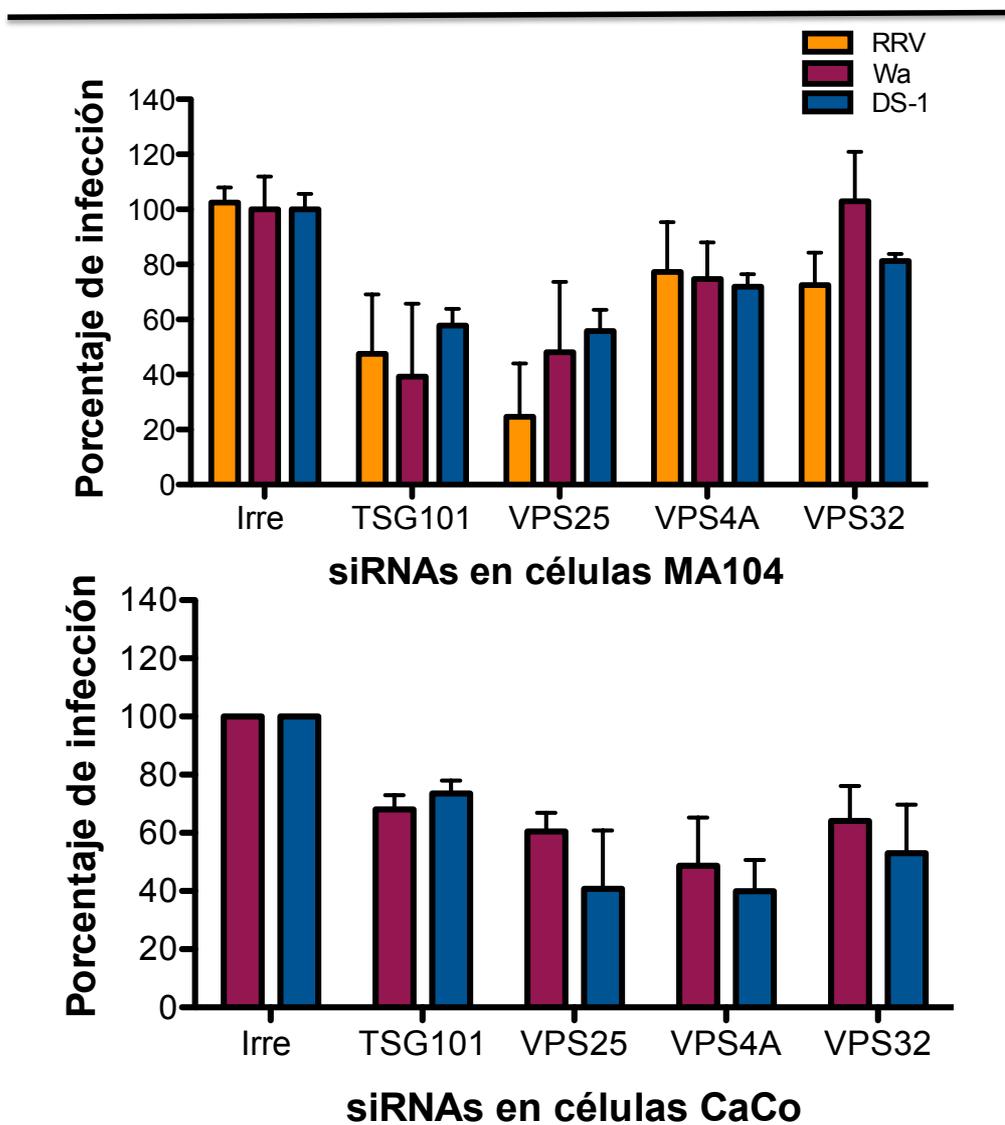


Figura 2.12. La maquinaria de ESCRT es un requerimiento conservado en la entrada de rotavirus. Células tratadas con los siRNAs indicados; después de 72 horas. de incubación, se infectaron con las cepas indicadas (MOI=3) en células MA014 (a) o CaCo-2 (b). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un siRNA irrelevante para la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

La infectividad de las tres cepas, RRV, Wa y DS-1, se ve también disminuida en células humanas epiteliales, CaCo-2 (**Figura 2.12b**). Estos resultados confirman que la participación de la maquinaria de ESCRT en el proceso infeccioso de rotavirus es un requerimiento conservado en cepas de distinto origen y en diferentes modelos de células hospederas.

Una de las características de los procesos endocíticos dependientes de ESCRT, es la formación de vesículas intraluminales (ILVs). Estas vesículas se acumulan dentro de los compartimentos endosomales dando lugar a lo que se conoce como cuerpos multivesiculares (MVB). La curvatura en las membranas endosomales en donde se produce el proceso de invaginación para dar lugar a una ILV se lleva acabo específicamente en dominios ricos en ácido lisobisfosfatídico (LBPA), fosfolípido que es crítico en la formación de estas vesículas. Para evaluar la importancia de la formación de ILVs en la infectividad de rotavirus, utilizamos un anticuerpo dirigido contra este lípido, que se sabe bloquea la formación de las ILVs

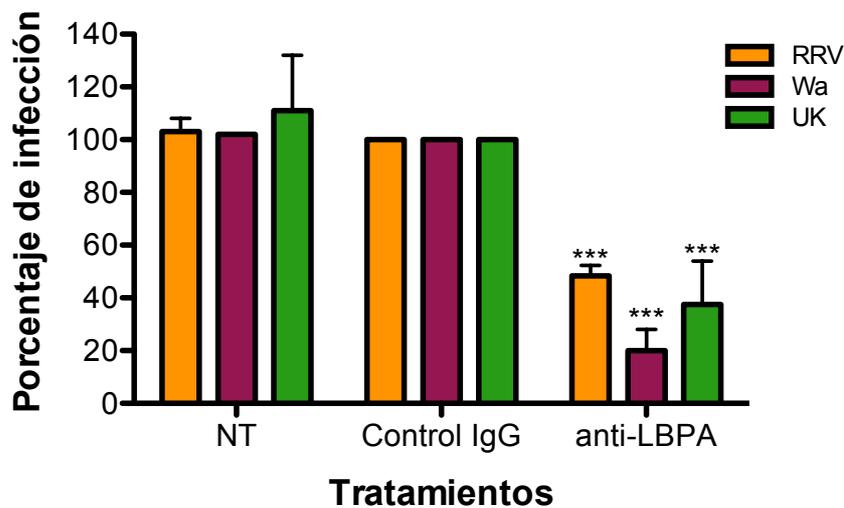


Figura 2.13. La formación de ILVs es necesaria en la entrada de rotavirus. Células incubadas por 1 hora con 50 mg/ml de un anticuerpo monoclonal contra LBPA o con un isotipo control, se infectaron con las cepas RRV, Wa y UK (MOI=3). La detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

. El anticuerpo fue previamente incubado en células MA104 y, tras su internalización por fusión pasiva [84], las células se infectaron con las cepas indicadas del virus. Con este anticuerpo, observamos una disminución de 50% en la infectividad de las cepas RRV, Wa y UK en comparación con células tratadas con el isotipo control (IgG1) (**Figura 2.13**).

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de los cuatro complejos de la maquinaria de ESCRT en la entrada de cepas de rotavirus de

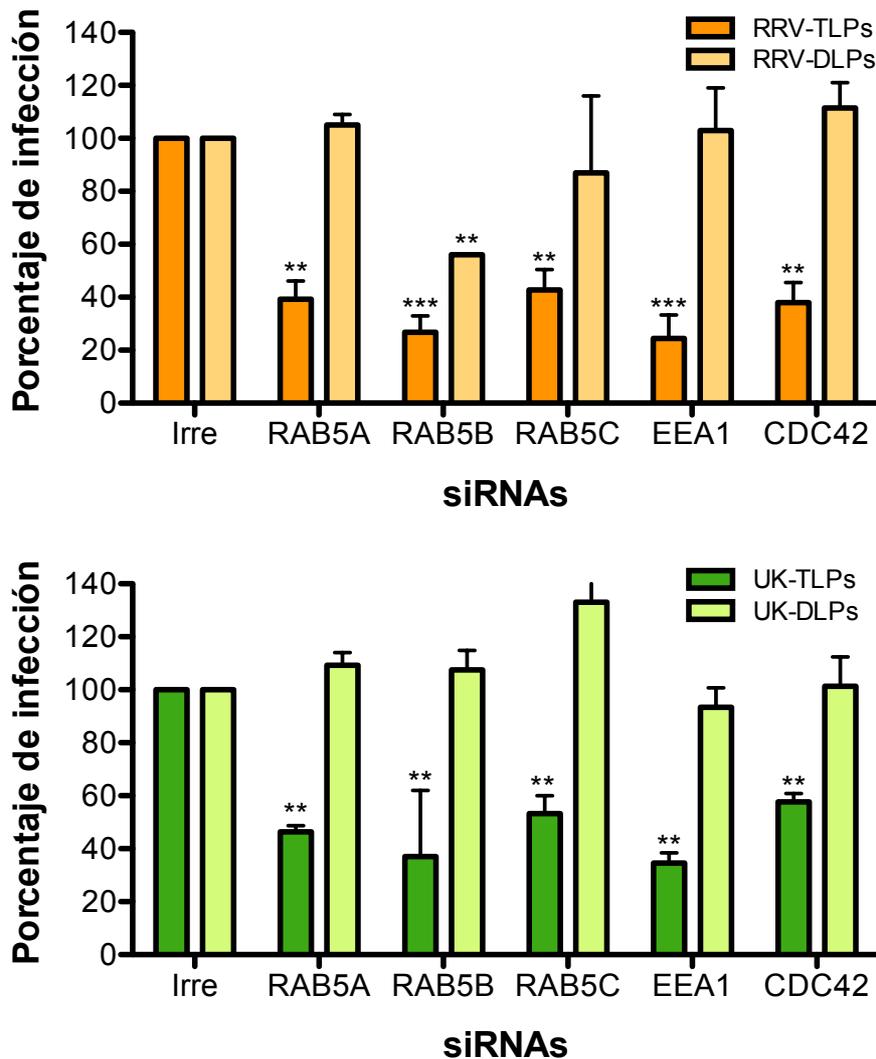


Figura 2.14. La disminución de la expresión de GTPasas componentes del endosoma temprano generan una disminución en la infectividad de rotavirus. Células tratadas con distintos siRNAs; después de 72 horas de incubación, se infectaron con la cepa RRV (a) o UK (b) de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de

células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un siRNA irrelevante para la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

distinto origen y en diferentes tipos de célula. Además, mostramos que la formación de las vesículas intraluminales es un requisito en los procesos de entrada de estos virus.

Componentes endosomales en la entrada de rotavirus

Como siguiente paso en la caracterización de la entrada de rotavirus, decidimos evaluar la participación de proteínas que se usan de manera genérica en la vía endosomal. Así, mediante RNAi, disminuimos la expresión de las proteínas RAB5A, RAB5B, RAB5C y EEA1, marcadores de endosoma temprano; y CDC42, GTPasa encargada de regular eventos de polimerización de actina. Todas estas proteínas resultaron ser importantes para la infección por rotavirus, además de ser específicas de la etapa de entrada del virus a la célula (**Figura 2.14**). La isoforma RAB5B generó una disminución en la infectividad de RRV-DLPs por más del 40%, lo que sugiere que participa en procesos posteriores a la entrada del virus a la célula, aunque no puede descartarse que también participe en los eventos iniciales de la infección. En contraste, la participación de esta proteína en el proceso infectivo de UK está restringido a la fase de entrada.

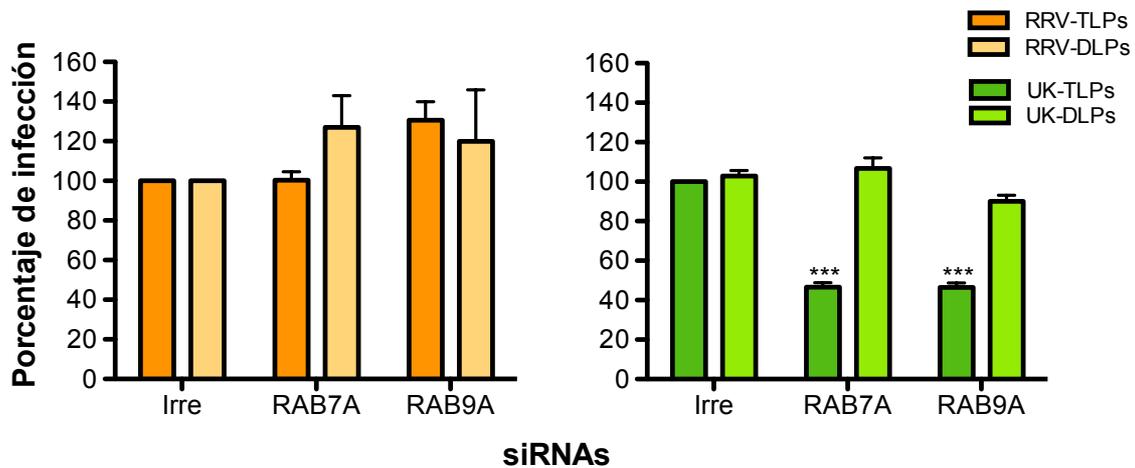


Figura 2.15. La cepa UK de rotavirus requiere la formación de endosomas tardíos en su proceso de entrada. Células tratadas con distintos siRNAs; después de 72 horas de incubación, se infectaron con la cepa RRV (a) o UK (b) de rotavirus (MOI=3). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con un siRNA irrelevante para la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5.

Continuando con la caracterización de los compartimentos endosomales, evaluamos la participación de las GTPasas RAB7, marcador de endosoma tardío y RAB9, GTPasa, que se ha descrito participa en el tráfico de endosoma tardío al trans-Golgi (TGN) (**Figura 2.15**).

Los tratamientos con siRAB7A y siRAB9A generaron una disminución de más del 50% en la infectividad de la cepa UK de rotavirus. Lo que sugiere que, aun cuando las cepas RRV y UK llegan al endosoma temprano en su proceso endocítico, el tráfico intracelular de la cepa RRV es restringido a este compartimento, mientras que la cepa UK llega al endosoma tardío.

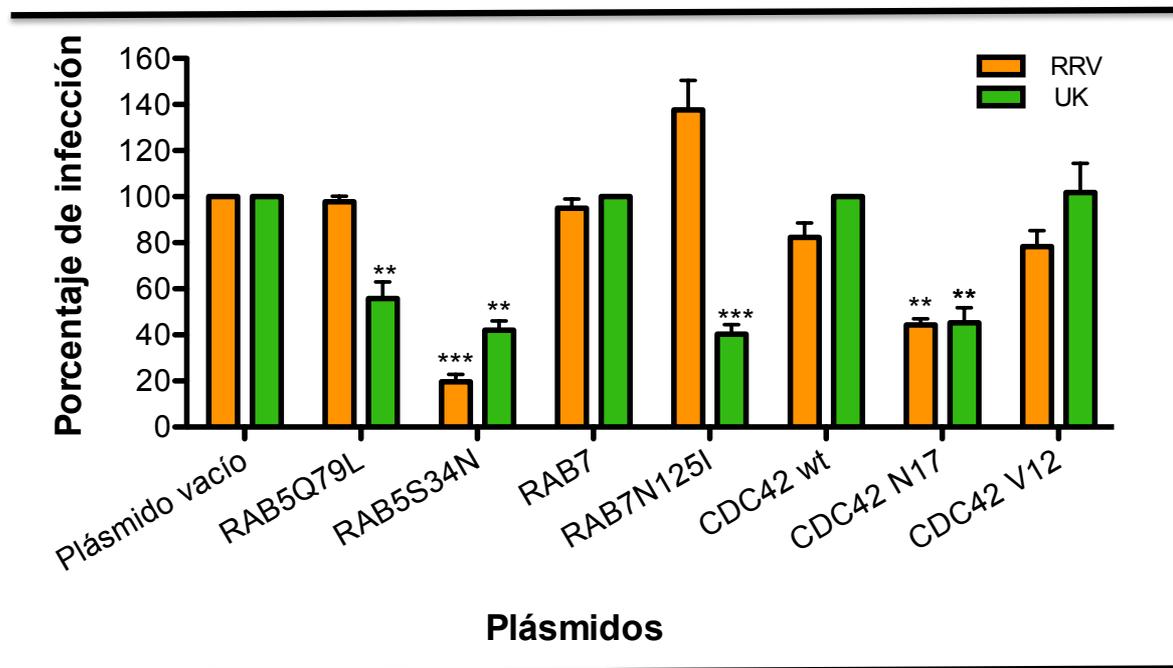


Figura 2.16. Células MA104 se transfectaron con distintos plásmidos; después de 24 horas de incubación se infectaron con la cepa RRV de rotavirus (MOI=5). El porcentaje de infectividad se evaluó tras la cuantificación de células infectadas en ensayos de inmunofluorescencia normalizadas contra células transfectadas con siRNA irrelevante en la infección por rotavirus; la detección de la proteína viral se efectuó con el anticuerpo policlonal α NSP5 para la identificación de viroplasmos.

Estos resultados se reforzaron con ensayos donde, tras la expresión de DN de las proteínas RAB5A y CDC42, la infectividad de ambas cepas de virus se ve comprometida, mientras que para la cepa UK la expresión de la mutante constitutivamente activa de RAB5A, RAB5Q79L, que se sabe bloquea la maduración de EE a LE, inhibe su infectividad en más de un 30%. Adicionalmente, las DN de las GTPasas RAB7A y RAB9A inhiben sustancialmente la infectividad de la cepa UK, sugiriendo que además de llegar a LE, esta cepa requiere de un tráfico intracelular activo entre LE y TGN (Figura 2.16).

Cinéticas de entrada de rotavirus

Una vez definida la participación funcional de proteínas del complejo ESCRT₁ así como de GTPasas en la entrada de rotavirus a la célula

hospedera, nuestro interés consistió en encontrar evidencia física de la interacción de estas proteínas celulares en las fases tempranas del ciclo replicativo de rotavirus. Para esto llevamos a cabo co-localizaciones de las partículas virales con estos componentes de la vía endocítica usando microscopía confocal (**Figura 2.17**). La detección de las partículas se realizó mediante el uso de dos anticuerpos que reconocen diferencialmente al virión: un policlonal que reacciona con todas las proteínas estructurales del virus (α -TLPs) y un monoclonal (C159) que sólo identifica a la proteína VP7 cuando ésta se encuentra como trímero, ensamblada en el virión maduro. Para evaluar la autenticidad y consistencia de la señal correspondiente a una partícula entrante de rotavirus evaluamos, por inmunofluorescencia, el efecto de incubar las células con neuraminidasa, sobre la unión del rotavirus RRV a la membrana celular (su pegado es sensible a la neuraminidasa). Las células tratadas fueron incubadas con TLPs purificadas, a una MOI de 50, por 1 h a 4°C con el objetivo de permitir que las partículas virales se unieran a la superficie celular de forma sincronizada (**Figura 2.17a, b**). Los tratamientos con neuraminidasa (NA), enzima que corta ácidos siálicos terminales, generaron una disminución de la señal similar a aquellas obtenidas en células no infectadas, dato que sugería que la señal observada era proveniente de partículas virales unidas a la membrana celular.

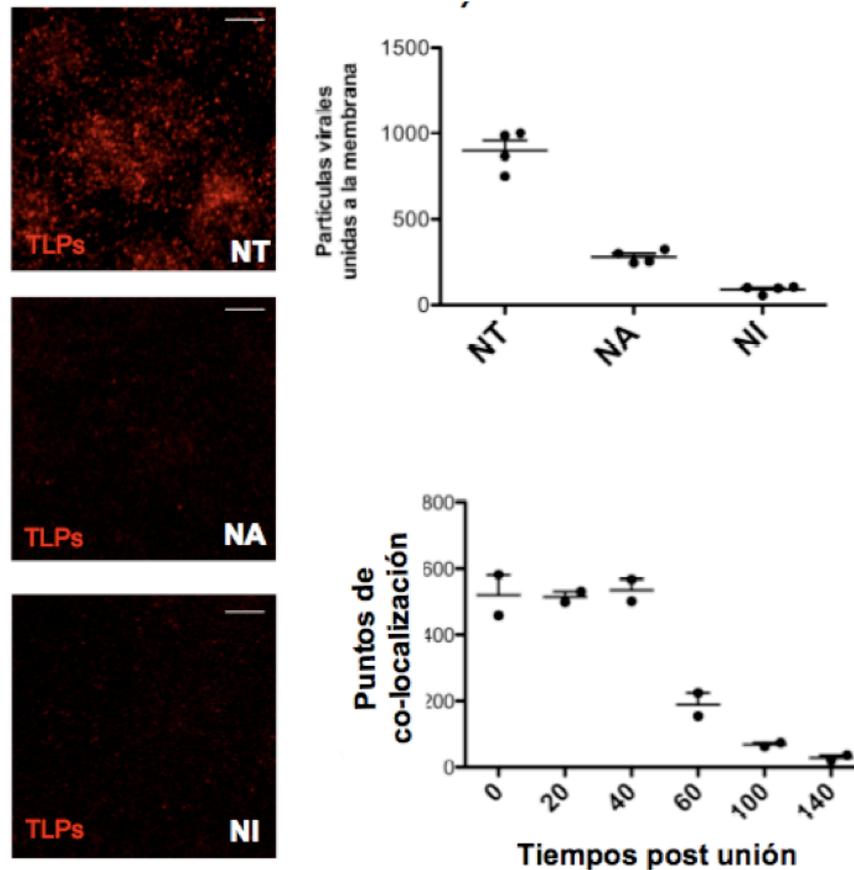


Figura 2.17. Identificación de partículas virales por microscopía confocal. a) La identificación de partículas de rotavirus por microscopía confocal se redujo de manera significativa por el tratamiento de las células con neuraminidasa. NT – Células sin tratar; NA – células tratadas con neuraminidasa; NI – Células no infectadas. b) Cuantificación por célula de partículas de rotavirus. Las imágenes derivadas de la microscopía confocal se analizaron utilizando ImageJ. TLPs purificadas de rotavirus de la cepa RRV (MOI 50) se incubaron con células MA104 tratadas o no con 10 mU/ml de NA at 37°C por una hora. Posteriormente se incubaron las células a 4°C con las TLPs de RRV. Se analizaron las células sin permeabilizar por inmunofluorescencia. Las partículas virales se detectaron utilizando un anticuerpo primario anti-TLPs y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa-568. c) Co-localización de partículas virales que fueron seguidas durante su internalización y detectadas con dos anticuerpos distintos dirigidos contra proteínas estructurales de rotavirus d) Cuantificación de la co-localización de las proteínas virales. Se incubaron células MA104 con TLPs por una hora a 4°C, posteriormente se cambiaron rápidamente a 37C y se fijaron para inmunofluorescencia a diferentes tiempos. Las partículas de rotavirus se detectaron de manera indirecta utilizando un anticuerpo anti-TLPs y el mAb 159 como anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 y 568, respectivamente. Se muestran imágenes representativas. Escala =5µm.

Para evaluar el proceso de infección del virus a tiempos tempranos de la infección, en particular para evaluar la pérdida de la capa externa del virión, infectamos células con RRV a una MOI=50; la infección fue sincronizada

incubando el virus por 1 hora a 4°C y las células se cambiaron posteriormente a 37°C para continuar con la infección. A diferentes tiempos post-infección teñimos las células con los anticuerpos α -TLPs y C159.

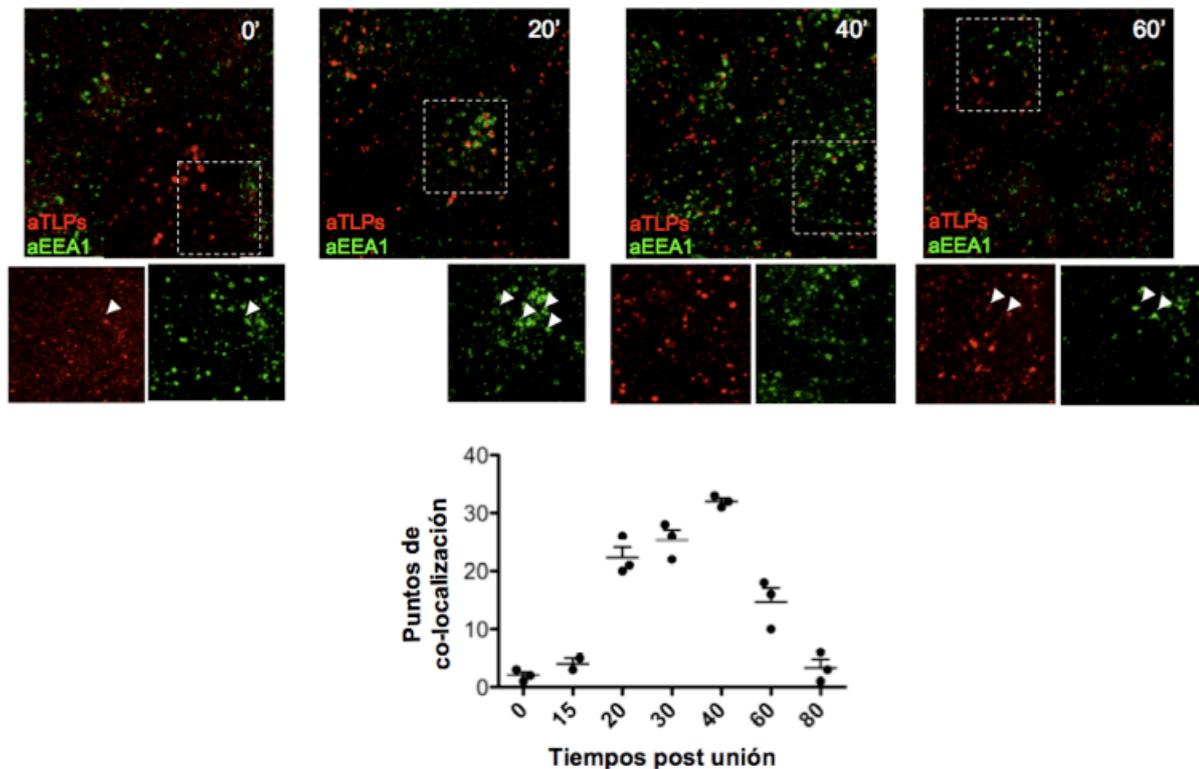


Figura 2.18. Co-localización de partículas virales con componentes de EE. a) La proteína EEA1 se co-localizó con partículas de RRV a distintos tiempos post-uni3n. b) Cuantificaci3n del grado de co-localizaci3n.

Observamos que en los tiempos de 0 a 40 min hay una co-localizaci3n significativa entre la se1al generada por ambos anticuerpos; sin embargo, en el lapso de 40 a 60 min se observa una disminuci3n en esta co-localizaci3n, resultado de la desaparici3n de la se1al por el anticuerpo C159. Como se mencion3 anteriormente, el anticuerpo C159 detecta exclusivamente 3pitopes en la prote3na estructural VP7, cuando 3sta se encuentra en forma trim3rica e incorporada a las part3culas de TLPs. Tras el desencapsidamiento del viri3n (p3rdida de la tercera capa de prote3nas formada por tr3meros de VP7 y VP4), este anticuerpo no detecta subunidades individuales de VP7. Lo anterior indica

que el tiempo estimado del desnudamiento de la partícula viral es entre los 40 y 60 min post unión del virus a la célula (**Figura 2.17c, d**).

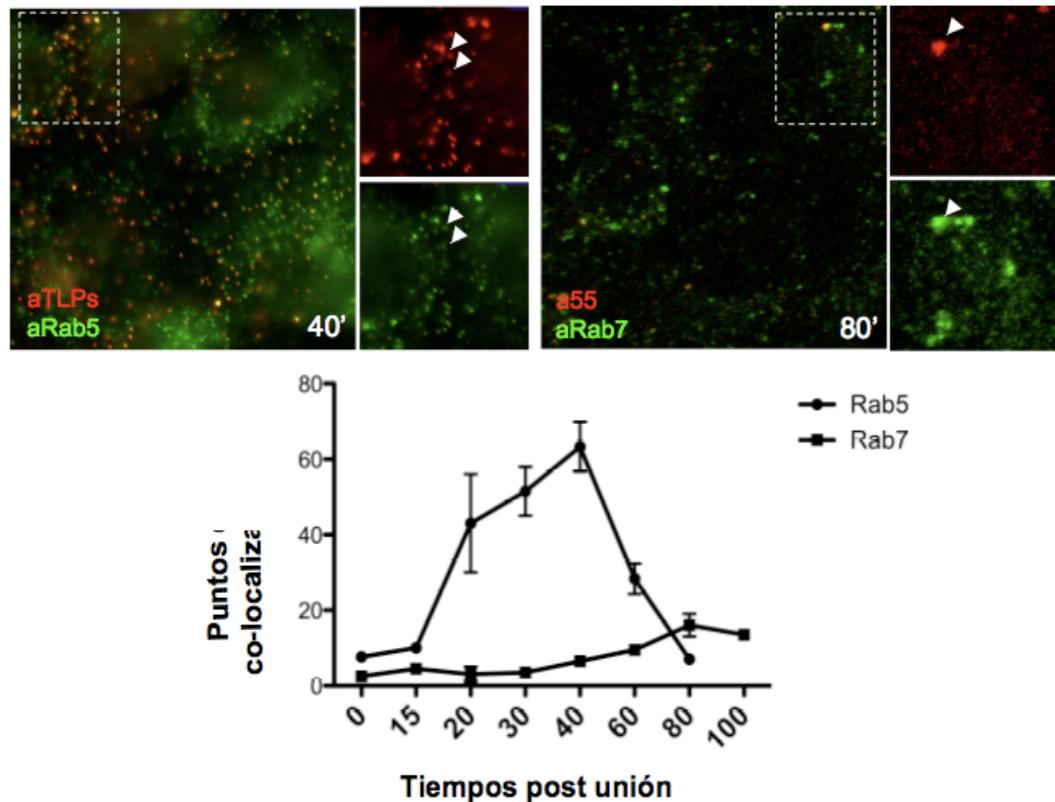


Figura 2.19. La cepa RRV de rotavirus co-localiza con EE en tiempos tempranos. a) Las Rab5 y Rab7 endógenas se co-localizaron con partículas de RRV a distintos tiempos post-unión. b) Cuantificación del grado de co-localización. Se incubaron células MA104 con TLPs de RRV purificadas (MOI 50) a 4°C durante una hora y posteriormente se pasaron rápidamente a 37°C para permitir la internalización del virus. Se detectaron Rab5 y Rab7 por inmunofluorescencia (Verde) utilizando anticuerpos comerciales (Cell Signaling), el virus (rojo) se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TLPs (mAb 255)

Se evaluaron también por inmunofluorescencia las cinéticas de co-localización de RRV con la proteína EEA1; los eventos de co-localización virus-EEA1 inician a los 20 min post-unión, llegando a su máximo a los 40 min (**Figura 2.18a, b**). Resultados similares se obtuvieron al detectar a la partícula viral y a la proteína RAB5 (**Figura 2.19**). En contraste, no se observó una co-localización significativa del virus con RAB7, marcador de endosomas tardíos (Anexo3).

Estos resultados apoyan la participación funcional de las proteínas EEA y RAB5 en el proceso de entrada de ambas cepas, RRV y UK. Adicionalmente, la falta de co-localización de la cepa RRV con GTPasa RAB7, apoya la observación que las partículas de RRV se liberan al espacio citoplásmico desde los EE, definiéndola como una cepa de penetración temprana. En contraste, la co-localización de la cepa bovina UK con RAB7, un componente tardío del proceso endocítico, define a esta cepa como de penetración tardía. Estas observaciones ejemplifican la variabilidad en estrategias de entrada que pueden presentar los miembros del género rotavirus (Anexo 3).

Por último, evaluamos la co-localización de RRV con componentes de la maquinaria ESCRT. Cuantificamos la incidencia de la partícula viral en dominios de expresión de CFP-HRS y YFP-TSG101 en ensayos independientes (**Figura 2.20**). Las cinéticas demostraron que la proteína TSG101 co-localiza significativamente con el virus a los 20 min post-unión, mientras que la co-localización de HRS inicia desde el minuto 15. Como control negativo analizamos la co-localización del virus en células que expresaban la DN GFP-T1SG01 1-157. En células que expresaban al componente defectivo de ESCRT no se observó una co-localización significativa de la proteína TSG101 y las partículas virales; así como con el marcador de EE, EEA1 (Datos no mostrados). Lo anterior sugiere que la DN GFP-T1SG01 1-157 inhibe el tráfico intracelular productivo del virus.

La co-localización con componentes de la maquinaria de ESCRT, evaluada por microscopía confocal, confirma que la maduración de los compartimentos endosomales en el tráfico intracelular de rotavirus, es orquestado secuencialmente por los componentes de esta versátil vía celular. La disminución en la infectividad de rotavirus en células que expresan DN de los componentes de ESCRT correlaciona con la falta de co-localización de estos componentes con las partículas virales a tiempos tempranos de la infección. Estos experimentos apoyan la importancia funcional de la maquinaria de ESCRT en el proceso de entrada de rotavirus (Anexo 3 y 4).

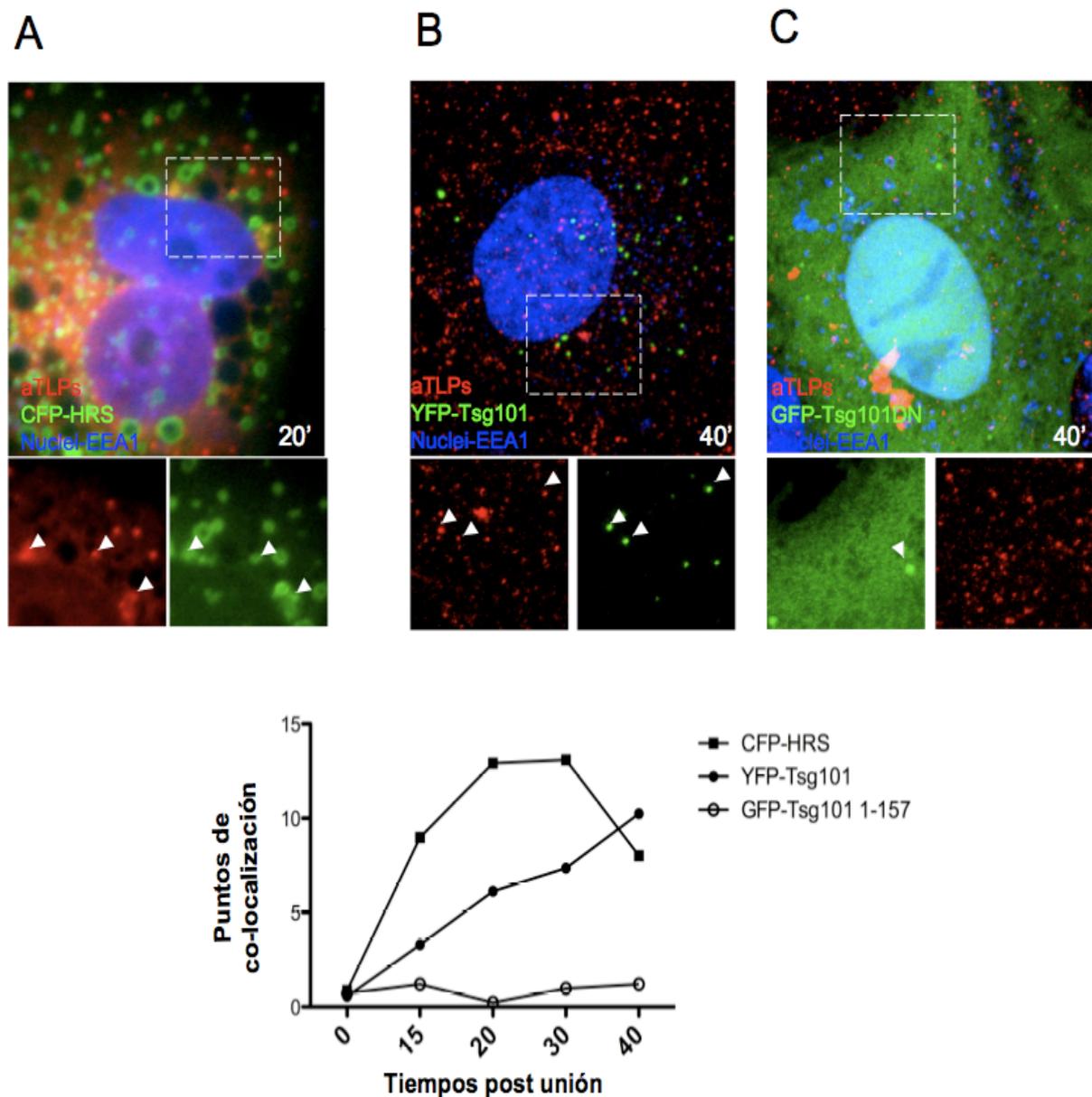


Figura 2.20. Rotavirus co-localiza con ESCRT en tiempos tempranos. a) Entrada de RRV pre-adsorbido a células que expresan A, CFP-HRS; B, YFP-Tsg101 y C, GFP-Tsg101 1-157 analizada por microscopía confocal. b) Cuantificación de la co-localización. Después de la adsorción a células MA104 por 1hr a 4°C se permitió la internalización de las partículas virales y se fijaron las células a distintos tiempos. Las partículas de RRV se detectaron utilizando un anticuerpo primario anti-TLPs y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 588 (A) y Alexa 568 (B y C). La gráfica muestra el porcentaje de co-localización entre las partículas de RRV y las distintas proteínas fluorescentes, derivado de la cuenta de la co-localización entre ambas señales de manera relativa a todas las partículas virales por célula. Se muestran imágenes representativas del tiempo post-adsorción en el que se detectó el mayor número de eventos de co-localización. Escala =5µm.

Discusión

La disponibilidad de la información genética de muchos organismos ha impulsado el desarrollo de herramientas bioinformáticas y experimentales que permiten el manejo de grandes cantidades de datos. La ventaja que nos ofrece el análisis global de los genes de cualquier organismo es la generación de conclusiones a nivel genómico, tales como la identificación de parámetros evolutivos, la contribución de grupos de genes a fenotipos particulares, la identificación de proteínas de vías metabólicas específicas, entre otras. En este trabajo logramos identificar 522 proteínas celulares importantes para el ciclo de replicación de rotavirus, mediante el uso de una biblioteca de siRNAs dirigida contra todo el genoma de la célula hospedera.

El análisis funcional de nuestro grupo de datos permitió identificar varias proteínas y vías biológicas que ya habían sido definidas como importantes en la infección del virus, como la participación de integrinas y la regulación de calcio celular, entre otras; también encontramos vías celulares de las que se desconocía su participación en la infección viral. Así, demostramos que las uniones estrechas son importantes, y logramos identificar a la proteína JAM-A como un componente relevante. Esta proteína de uniones estrechas se ha descrito como receptor principal para reovirus. La proteína de unión s1 de reovirus desestabiliza el dímero extracelular de JAM-A para interactuar con una molécula individual, en la misma interfase que JAM-A utiliza para su homodimerización. Reovirus es miembro de la familia *Reoviridae*, al igual que rotavirus, y comparten algunas características estructurales que se han descrito son importantes en los procesos tempranos de la infección.

En este trabajo confirmamos la participación de la molécula JAM-A en la infección por rotavirus, identificada mediante experimentos con RNAi, a través de utilizar un ensayo de bloqueo con un péptido que interactúa específicamente con el dominio extracelular de JAM-A. Esto permitió sugerir la importancia de esta proteína en los eventos de unión del virus a la célula. El papel de JAM-A y de otras proteínas de uniones estrechas, como ocludina y ZO-1, en la infección del rotavirus RRV y de otras cepas de rotavirus, se ha

seguido caracterizando y constituyen la tesis doctoral del MC Jesús Torres en nuestro laboratorio.

Por otro lado, corroboramos la importancia de la vía de ubiquitinación-proteasoma. Mediante el uso de siRNAs dirigidos contra los mRNAs de los componentes del proteasoma, y de inhibidores específicos de la subunidad 26S, demostramos que para la replicación eficiente de rotavirus se necesita un sistema de degradación proteasomal activo. Previo a este estudio se había descrito que el sistema de ubiquitinación-proteasoma es relevante en la infección por rotavirus, posiblemente en el control de la respuesta inmune innata, ya que durante la infección por rotavirus varias moléculas son degradadas por esta vía, incluyendo elementos de respuesta del interferón. Nuestros resultados identificaron un papel directo de la vía de ubiquitinación y proteasoma en el ciclo de replicación del virus. Definimos que su participación no es a nivel de entrada, sino requerida para una eficiente producción de proteínas virales, además de participar en el reclutamiento de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP6 a los viroplasmos. Adicionalmente, se observó que tras bloquear la funcionalidad de la vía de ubiquitinación-proteasoma la replicación del genoma viral se ve comprometida [83]. Gran cantidad de virus requieren la funcionalidad de esta vía celular para distintas fases de sus ciclos replicativos. Se ha definido que para los procesos de entrada a la célula hospedera, los virus de influenza, coronavirus y parvovirus requieren la funcionalidad de este sistema [85, 86]. Por otro lado, el virus Sendai, el virus de la estomatitis vesicular y el VIH-1 y 2 necesitan esta vía en su fase de salida de la célula [87-89]. Para rotavirus, la participación del sistema ubiquitinación-proteasoma pareciera ser a distintos niveles de su ciclo replicativo; las moléculas celulares y virales protagonistas en esta vía celular requerida en la infección están aún por caracterizarse.

El interés de esta tesis se centró principalmente en la caracterización del grupo de proteínas resultantes del tamizaje con siRNAs pertenecientes a la vía de endocitosis. Después de comprobar el efecto de estos siRNAs en la infección por rotavirus y evaluar la eficiencia del silenciamiento a través de

cuantificar el mensajero por RT-PCR, confirmamos la participación de varias proteínas de procesos endocíticos en la entrada del virus a la célula. Las proteínas relacionadas con estos procesos se organizaron en 4 subgrupos con base en su función dentro de esta vía: a) ATPasa vacuolar; b) GTPasas; c) Complejo COPI y; d) Maquinaria ESCRT.

En estudios recientes se demostró que el bloqueo de la acidificación de endosomas utilizando bafilomicina A (droga que bloquea la función de la ATPasa vacuolar) afecta la infectividad de rotavirus notoriamente [20, 36]; esta observación fue sustancialmente enriquecida en este trabajo al demostrar que el silenciamiento de dos subunidades (ATP6V0C y ATP6V1B1) de la H⁺ATPasa vacuolar afectan la infectividad del virus durante el proceso de entrada y que su efecto se limita a la fase inicial de la infección. Lo anterior sugiere que este complejo proteico participa en la regulación de la acidificación endosomal tras la entrada del virus.

Asimismo, se corroboró la participación de las RAB GTPasas RAB2LA y RAB30. Aunque RAB2LA no ha sido funcionalmente caracterizada [90], la proteína RAB30 participa en el mantenimiento de la morfología del aparato de Golgi [91]. Sabemos que la partícula viral no llega a este compartimento, por lo que son necesarios más ensayos que permitan definir la participación de esta proteína en la entrada del virus.

En contraste con los resultados mencionados, se definió que el complejo COPI tiene una participación en el ciclo replicativo de rotavirus posterior a su fase de entrada. Se sabe que este complejo participa en el tráfico vesicular retrógrado que existe entre el aparato de Golgi y el RE, y que su funcionalidad promueve la maduración e identidad de estos dos compartimentos [92]. Rotavirus, en su proceso de morfogénesis, utiliza componentes genéricos del RE, como Calnexina y PDI [78]; la participación del tráfico intracelular orquestado por componentes de COP1 podría estar relacionada con la localización de estos componentes en el RE y lograr así un ciclo infeccioso productivo. Adicionalmente, estas proteínas participan en la

formación de las gotas lipídicas, componentes de las cuales se han visto asociadas a viroplasmias en una infección por rotavirus; la participación de este complejo en la estabilidad y formación de viroplasmias, tampoco puede descartarse. El papel del complejo COPI en el ciclo de replicación de rotavirus está siendo actualmente estudiado en el laboratorio, y es el tema del estudiante de maestría José Luis Martínez.

Dentro de las proteínas identificadas en el tamizaje encontramos dos componentes de la maquinaria de ESCRT (VPS25 y VPS37D). La caracterización de la funcionalidad de este complejo en la infección por rotavirus se realizó utilizando varias cepas de distinto origen: RRV (rhesus), UK (bovino), DS-1 y Wa (humano). Igualmente, se caracterizó su relevancia para la infección del virus en dos líneas celulares, MA104 y CaCo-2, derivadas de células epiteliales de riñón de mono y epitelio humano intestinal, respectivamente. Previamente se había descrito que las cepas UK, WA y DS-1 entran a la célula hospedera por un proceso de endocitosis dependiente de clatrina, mientras que para la cepa RRV se desconoce la molécula involucrada en la formación de la vesícula primaria [20, 36], lo que sugiere vías de entradas disímiles. Decidimos evaluar si la participación de los componentes de ESCRT era un proceso conservado en cepas de rotavirus que se sabe, utilizan estrategias diferentes en su proceso de entrada a la célula.

Una vez confirmada la participación de VPS25 y VPS37D en la entrada del virus por RNAi, realizamos la caracterización de otros componentes del complejo: HRS (EXCRT-0), TSG101 (ESCRT-I), VPS24 (ESCRT-III), VPS4A (miembro del complejo ATPasa) y ALIX (proteína accesoria). Encontramos que todas las cepas de rotavirus evaluadas utilizan los 4 subcomplejos para su entrada (cada uno de ellos representado en nuestro análisis por al menos 1 proteína), puesto que tras su silenciamiento por RNAi la infectividad del virus se afecta significativamente. Comprobamos estos resultados con la expresión de dominantes negativos de las proteínas TSG101, VPS4A y ALIX. Así, la expresión de las DN GFP-TSG101 1-157, DN

CFP-VPS4E228Q y YFP-ALIX 176-869 disminuyeron significativamente la infectividad del virus. Aún cuando la participación de la proteína accesoria ALIX en la replicación de rotavirus fue claramente evidenciada, su contribución pareciera no estar restringida a la entrada del virus a la célula, considerando que tratamientos con siRNAs contra ALIX disminuyen también la replicación de DLPs transfectadas.

Recientemente se describió la participación de los complejos ESCRT en procesos de infección viral, principalmente en el paso de salida de la célula de virus envueltos, como VIH-1 [93, 94]. También se ha reportado el uso del complejo de ESCRT durante el proceso de entrada de otros virus, incluyendo arenavirus, echovirus y VSV [84, 95]. Se demostró que estos virus requieren la formación de vesículas intraluminales (ILV), características de los cuerpos multivesiculares (MVB), que se forman durante un proceso orquestado por ESCRT. En este trabajo comprobamos que tres de las cepas de RV probadas, RRV, UK y Wa, requieren igualmente de la formación de ILVs.

Aun cuando no fueron definidas como positivas en el tamizaje, decidimos evaluar a varias GTPasas y proteínas genéricas de compartimentos endocíticos como parte de la caracterización de la entrada de rotavirus a la célula hospedera. Se evaluó la participación de RAB5 y EEA1, componentes de EE y endosomas en maduración; RAB7, componente del LE; y RAB9, necesaria en el tráfico entre endosomas tardíos y el aparato de Golgi [96, 97]. Adicionalmente, se evaluó la participación de estas proteínas en el proceso de infección de varias cepas de rotavirus: RRV, UK, Wa y DS-1.

Encontramos que la cepa RRV entra a la célula utilizando un tráfico celular restringido a los EE. Tras el silenciamiento de RAB5 y EEA1 se observó una disminución en la infectividad del virus, efecto que no fue observado en tratamientos contra la proteína RAB7, proteína de LE. Resultados similares se obtuvieron con la expresión de la proteína GFP-RAB5A/S43N, mutante que previene la fusión específica de vesículas primarias en EE. Tras su expresión, la eficiencia en la producción de

viroplasmas en células infectadas con rotavirus disminuyó significativamente. En contraste, la expresión de la proteína GFP-RAB5A/Q79L, mutante que aumenta la fusión homotípica de endosomas tempranos, promueve eventos endocíticos y bloquea la maduración de EE a LE [29], no generó un efecto en la replicación del virus. Estos resultados corroboran observaciones recientemente publicadas, en las que se describe que la cepa de rotavirus RRV, llega a EE pero no requiere componentes de los LE en su proceso infectivo [37, 38]. Sorprendentemente, encontramos que las cepas de RV que entran por un proceso endocítico dependiente de clatrina, no solamente requieren de la funcionalidad del EE, sino que además su infectividad se ve disminuida tras la expresión de la DN GFP-RAB5A/Q79L. Estas cepas requieren la funcionalidad de la GTPasa RAB7, pues tras su silenciamiento con siRNA y tras la expresión de la DN GFP-RAB7, la infectividad de estas cepas se ve también comprometida. Estos resultados permiten categorizar a las cepas de rotavirus en dos grupos con base a la naturaleza de su tráfico intracelular: los virus que presentan un tráfico restringido a EE (RRV), son denominados virus de penetración temprana, mientras que los virus con un tráfico vesicular que llega a LE (UK, Wa, DS-1) se denominan virus de penetración tardía. Es importante mencionar que todas las cepas de RV definidas como de penetración tardía requieren la funcionalidad de la GTPasa RAB9, lo que sugiere que las condiciones óptimas presentes en LE para que estas cepas penetren finalmente a la célula hospedera probablemente dependen de componentes que viajan entre el RE y LE.

Además de obtener evidencia funcional de la participación de estas proteínas en el ciclo de replicación del virus, a través del uso de siRNAs y mutantes DN, demostramos la co-localización de estos componentes celulares y las partículas virales de las cepas RRV y UK a tiempos tempranos de la infección, haciendo uso de microscopía confocal. Encontramos que la cepa RRV alcanza los endosomas tempranos entre 20 y 40 min post-unión a la membrana celular; lo anterior con base en la co-localización de la partícula viral con las proteínas RAB5 y EEA1 observada en los tiempos mencionados. Por otro lado, la cinética de llegada de UK a los EE es ligeramente más lenta

en comparación a la cepa RRV, presentando su máxima interacción con EEA1 a los 80 min post-uni6n a la membrana. Previamente se describi6 la naturaleza diferencial de las cin6ticas de entrada de estas dos cepas; se demostr6 que la cepa UK presenta un proceso de internalizaci6n a la c6lula hospedera m6s lento que la cepa RRV. En acuerdo con los resultados de RNAi, encontramos que la cepa RRV no prosigue su tr6fico a LE, puesto que no identificamos una co-localizaci6n significativa de part6culas virales de RRV con la prote6na RAB7.

Por otro lado, cuantificamos la co-localizaci6n de estas cepas con los componentes de ESCRT, HRS y TSG101; la co-localizaci6n de RRV y UK con la prote6na HRS inicia a los 15 y 40 min post-uni6n, respectivamente. Se conoce que la participaci6n de esta prote6na en eventos tempranos consiste en reconocimiento del cargo en la membrana plasm6tica, por lo que la interacci6n temprana de HRS con el virus era esperada. La co-localizaci6n de la prote6na TSG101 con ambas cepas fue en tiempos similares a los observados con las prote6nas RAB5 y EEA1; se sabe que, tras el estimulo de una mol6cula cargo en la membrana plasm6tica, TSG101 migra hasta endosomas tempranos para posteriormente madurar a endosomas tard6os [53, 54]. Estos resultados corroboran la participaci6n de la maquinaria de ESCRT y de las distintas GTPasas en el proceso de internalizaci6n de las cepas RRV y UK a su c6lula hospedera.

La caracterizaci6n de la entrada de una colecci6n de re-arreglantes entre los virus UK y RRV permiti6 definir que la internalizaci6n, as6 como las caracter6sticas del trafico intracelular de cada cepa, es determinada por la prote6na VP4 del virus [36]. Se ha propuesto que esta prote6na, tras un rearrreglo estructural donde se exponen los dominios hidrof6bicos de VP5, es capaz de desestabilizar membranas lip6dicas, siendo entonces la responsable del 6ltimo paso en la penetraci6n del virus al espacio citopl6smico [8, 25-27]. Este requerimiento pudiera depender de factores celulares y/o condiciones endosomales que disparen este cambio estructural en la prote6na viral. Los diferentes compartimentos endosomales en donde las cepas RRV y UK llevan

acabo su paso de penetración, sugiere que los factores requeridos para este paso, aún desconocidos, pudieran ser también diferenciales. Es de particular interés en el área de estudio de entrada de rotavirus caracterizar las moléculas que definen y dirigen el tráfico intracelular particular de cada cepa.

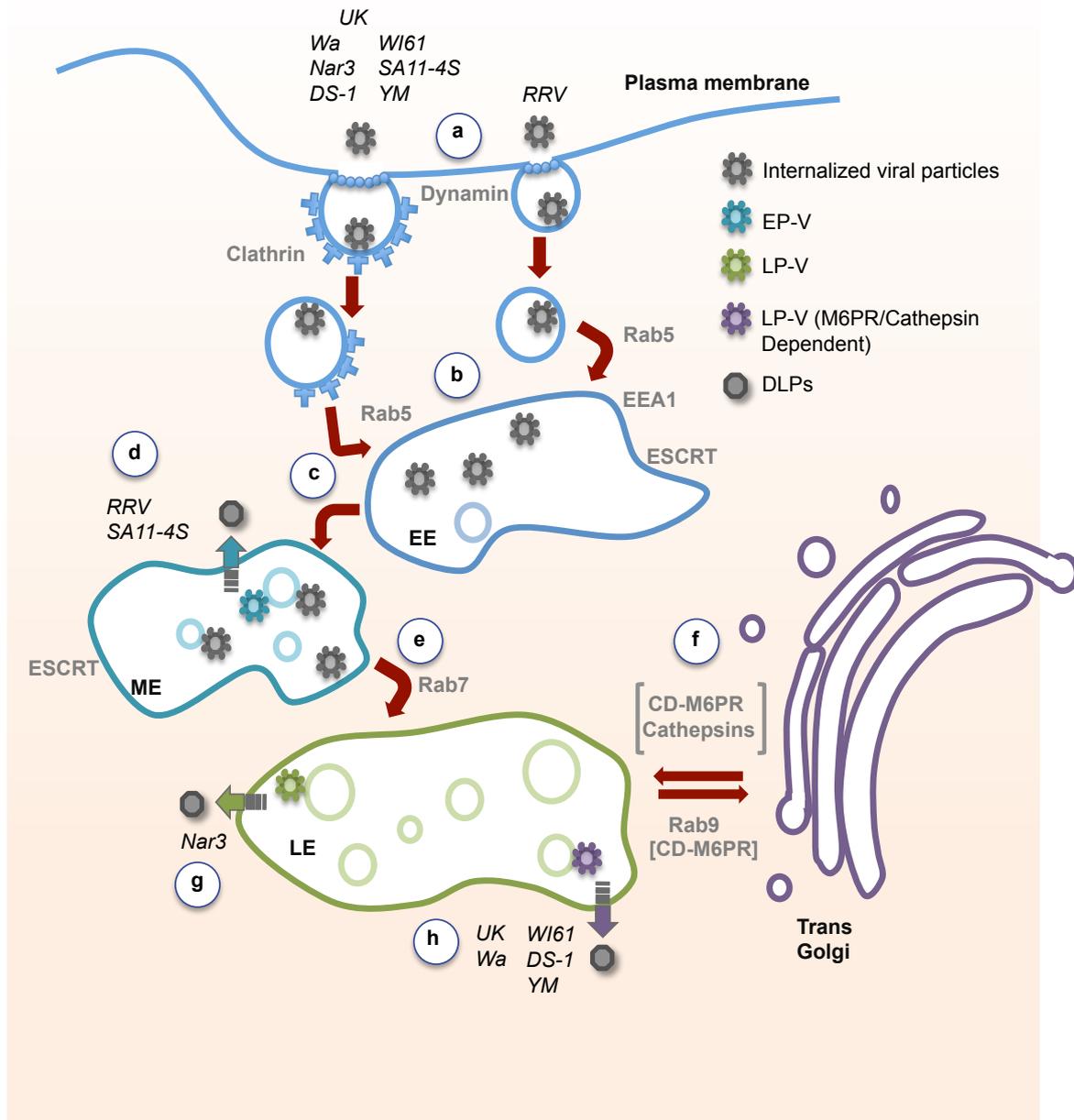


Figura 3.1. Entrada de Rotavirus a la célula hospedera.

Es intrigante la forma en que las distintas cepas de RV manipulan la maquinaria de ESCRT y cómo la formación de ILVs es un requisito crucial en la entrada de RV a la célula. Se sabe que los cuerpos MBV son centros de

enriquecimiento de varias proteínas (integrinas, componentes de uniones estrechas) y otras moléculas celulares, como lípidos [53, 54]. Estos MBV podrían ser el centro de nucleación de factores necesarios en los procesos de internalización de RV al espacio citoplásmico.

Este trabajo describe de forma detallada la participación de varios componentes celulares en el proceso de entrada de varias cepas de rotavirus a su célula hospedera y ejemplifica la complejidad del proceso de entrada de los virus (**Figura 3.1**). En resumen, este estudio ilustra la utilidad de ensayos genómicos para el mapeo de proteínas y vías celulares importantes en el ciclo replicativo de un virus. Además, representa una herramienta útil en el posible estudio de otros procesos biológicos que son importantes en la interacción patógeno-hospedero, y que pudieran representar un blanco importante en estrategias terapéuticas.

Referencias

1. S. J. Flint, L.W.E., V. R. Racaniello, A. M. Skalka, *Principles of Virology*. Third Edition ed. Vol. 1. 2009, Wahington, DC: ASM Press.
2. Bishop, R.F., et al., *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis*. *Lancet*, 1973. **2**(7841): p. 1281-3.
3. Mary K. Estes, H.B.G., *Rotaviruses*, in *Fields Virology*, P.M.H. David M. Knipe, Editor 2013, Lippincott Williams &Wilkins. p. 1347-1401.
4. Trask, S.D., S.M. McDonald, and J.T. Patton, *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication*. *Nature reviews. Microbiology*, 2012. **10**(3): p. 165-77.
5. Mason, B.B., D.Y. Graham, and M.K. Estes, *Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome*. *Journal of virology*, 1983. **46**(2): p. 413-23.
6. 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.
7. Flewett, T.H., et al., *Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves*. *Lancet*, 1974. **2**(7872): p. 61-3.
8. Settembre, E.C., et al., *Atomic model of an infectious rotavirus particle*. *The EMBO journal*, 2011. **30**(2): p. 408-16.
9. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. *Virus research*, 2004. **101**(1): p. 67-81.
10. 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.
11. Patton, J.T. and D. Chen, *RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores*. *Journal of virology*, 1999. **73**(2): p. 1382-91.
12. Ayala-Breton, C., et al., *Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference*. *Journal of virology*, 2009. **83**(17): p. 8819-31.
13. Charpilienne, A., et al., *Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity*. *Journal of virology*, 2002. **76**(15): p. 7822-31.
14. Mansell, E.A. and J.T. Patton, *Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity*. *Journal of virology*, 1990. **64**(10): p. 4988-96.
15. Aoki, S.T., et al., *Cross-linking of rotavirus outer capsid protein VP7 by antibodies or disulfides inhibits viral entry*. *Journal of virology*, 2011. **85**(20): p. 10509-17.
16. Chen, J.Z., et al., *Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(26): p. 10644-8.
17. Aoki, S.T., et al., *Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab*. *Science*, 2009. **324**(5933): p. 1444-7.
18. Graham, K.L., et al., *Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands*. *The Journal of general virology*, 2005. **86**(Pt 12): p. 3397-408.

19. Guerrero, C.A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(26): p. 14644-9.
20. Gutierrez, M., et al., *Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis*. Journal of virology, 2010. **84**(18): p. 9161-9.
21. Isa, P., et al., *Dissecting the role of integrin subunits alpha 2 and beta 3 in rotavirus cell entry by RNA silencing*. Virus research, 2009. **145**(2): p. 251-9.
22. Lopez, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. Trends in microbiology, 2004. **12**(6): p. 271-8.
23. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. Journal of virology, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
24. Dormitzer, P.R., et al., *Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus*. Nature, 2004. **430**(7003): p. 1053-8.
25. Kim, I.S., et al., *Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry*. Journal of virology, 2010. **84**(12): p. 6200-7.
26. Trask, S.D., et al., *A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers*. Journal of virology, 2010. **84**(4): p. 1764-70.
27. Yoder, J.D., et al., *VP5* rearranges when rotavirus uncoats*. Journal of virology, 2009. **83**(21): p. 11372-7.
28. Martinez, M.A., et al., *Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry*. Journal of virology, 2013. **87**(2): p. 1115-22.
29. Haselhorst, T., et al., *STD NMR spectroscopy and molecular modeling investigation of the binding of N-acetylneuraminic acid derivatives to rhesus rotavirus VP8* core*. Glycobiology, 2007. **17**(1): p. 68-81.
30. Hu, L., et al., *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 256-9.
31. Huang, P., et al., *Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner*. Journal of virology, 2012. **86**(9): p. 4833-43.
32. Fleming, F.E., et al., *Determinants of the specificity of rotavirus interactions with the alpha2beta1 integrin*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(8): p. 6165-74.
33. Perez-Vargas, J., et al., *The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity*. Journal of virology, 2006. **80**(7): p. 3322-31.
34. Zarate, S., et al., *Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. Journal of virology, 2003. **77**(13): p. 7254-60.
35. Sanchez-San Martin, C., et al., *Characterization of rotavirus cell entry*. Journal of virology, 2004. **78**(5): p. 2310-8.
36. Diaz-Salinas, M.A., et al., *The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells*. Journal of virology, 2013. **87**(3): p. 1658-63.
37. Wolf, M., E.M. Deal, and H.B. Greenberg, *Rhesus rotavirus trafficking during entry into MA104 cells is restricted to the early endosome compartment*. Journal of virology, 2012. **86**(7): p. 4009-13.

38. Wolf, M., P.T. Vo, and H.B. Greenberg, *Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes*. Journal of virology, 2011. **85**(6): p. 2492-503.
39. McDonald, S.M. and J.T. Patton, *Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome*. Trends in microbiology, 2011. **19**(3): p. 136-44.
40. Montero, H., C.F. Arias, and S. Lopez, *Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis*. Journal of virology, 2006. **80**(18): p. 9031-8.
41. Montero, H., et al., *Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules*. Journal of virology, 2008. **82**(3): p. 1496-504.
42. Piron, M., et al., *Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3*. Journal of virology, 1999. **73**(7): p. 5411-21.
43. Rubio, R.M., et al., *Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs*. Journal of virology, 2013. **87**(11): p. 6336-45.
44. Contin, R., et al., *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins*. The Journal of general virology, 2010. **91**(Pt 7): p. 1782-93.
45. Eichwald, C., et al., *Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules*. PLoS one, 2012. **7**(10): p. e47947.
46. Patton, J.T., et al., *Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm*. Current topics in microbiology and immunology, 2006. **309**: p. 169-87.
47. Hu, L., et al., *Rotavirus non-structural proteins: structure and function*. Current opinion in virology, 2012. **2**(4): p. 380-8.
48. Pesavento, J.B., et al., *Rotavirus proteins: structure and assembly*. Current topics in microbiology and immunology, 2006. **309**: p. 189-219.
49. Mercer, J., M. Schelhaas, and A. Helenius, *Virus entry by endocytosis*. Annual review of biochemistry, 2010. **79**: p. 803-33.
50. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. Annual review of biochemistry, 2009. **78**: p. 857-902.
51. Marsh, M. and A. Helenius, *Virus entry: open sesame*. Cell, 2006. **124**(4): p. 729-40.
52. Williams, R.L. and S. Urbe, *The emerging shape of the ESCRT machinery*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(5): p. 355-68.
53. Babst, M. and G. Odorizzi, *The balance of protein expression and degradation: an ESCRTs point of view*. Current opinion in cell biology, 2013. **25**(4): p. 489-94.
54. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular body morphogenesis*. Annual review of cell and developmental biology, 2012. **28**: p. 337-62.
55. Grove, J. and M. Marsh, *The cell biology of receptor-mediated virus entry*. The Journal of cell biology, 2011. **195**(7): p. 1071-82.
56. Ghigo, E., et al., *Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis*. PLoS pathogens, 2008. **4**(6): p. e1000087.
57. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent*

- endocytosis*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(8): p. 603-12.
58. Johannsdottir, H.K., et al., *Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry*. Journal of virology, 2009. **83**(1): p. 440-53.
59. Schelhaas, M., et al., *Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells*. Cell, 2007. **131**(3): p. 516-29.
60. Jiang, M., et al., *Early events during BK virus entry and disassembly*. Journal of virology, 2009. **83**(3): p. 1350-8.
61. Quirin, K., et al., *Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes*. Virology, 2008. **378**(1): p. 21-33.
62. Cereijido, M., et al., *Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype*. Biochimica et biophysica acta, 2008. **1778**(3): p. 770-93.
63. Aktories, K. and J.T. Barbieri, *Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches*. Nature reviews. Microbiology, 2005. **3**(5): p. 397-410.
64. Yeaman, C., et al., *Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network*. Nature cell biology, 2004. **6**(2): p. 106-12.
65. Barton, E.S., et al., *Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus*. Cell, 2001. **104**(3): p. 441-51.
66. Cohen, C.J., et al., *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(26): p. 15191-6.
67. Evans, M.J., et al., *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 801-5.
68. Fellmann, C. and S.W. Lowe, *Stable RNA interference rules for silencing*. Nature cell biology, 2014. **16**(1): p. 10-8.
69. Li, Y., et al., *RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals*. Science, 2013. **342**(6155): p. 231-4.
70. Maillard, P.V., et al., *Antiviral RNA interference in mammalian cells*. Science, 2013. **342**(6155): p. 235-8.
71. Mohr, S., C. Bakal, and N. Perrimon, *Genomic screening with RNAi: results and challenges*. Annual review of biochemistry, 2010. **79**: p. 37-64.
72. Mohr, S.E. and N. Perrimon, *RNAi screening: new approaches, understandings, and organisms*. Wiley interdisciplinary reviews. RNA, 2012. **3**(2): p. 145-58.
73. Mendez, E., C.F. Arias, and S. Lopez, *Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus*. Journal of virology, 1996. **70**(2): p. 1218-22.
74. Pando, V., et al., *Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection*. Virology, 2002. **295**(1): p. 190-200.
75. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

76. Cheadle, C., et al., *Application of z-score transformation to Affymetrix data*. Applied bioinformatics, 2003. **2**(4): p. 209-17.
77. Lopez, T., et al., *Methods suitable for high-throughput screening of siRNAs and other chemical compounds with the potential to inhibit rotavirus replication*. Journal of virological methods, 2012. **179**(1): p. 242-9.
78. Maruri-Avidal, L., S. Lopez, and C.F. Arias, *Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles*. Journal of virology, 2008. **82**(11): p. 5368-80.
79. Mirazimi, A., C.H. von Bonsdorff, and L. Svensson, *Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing*. Virology, 1996. **217**(2): p. 554-63.
80. Diaz, Y., et al., *Expression of nonstructural rotavirus protein NSP4 mimics Ca²⁺ homeostasis changes induced by rotavirus infection in cultured cells*. Journal of virology, 2008. **82**(22): p. 11331-43.
81. Hyser, J.M., et al., *Activation of the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1 and store-operated calcium entry by rotavirus requires NSP4 viroporin activity*. Journal of virology, 2013. **87**(24): p. 13579-88.
82. Vedula, S.R., et al., *A comparative molecular force spectroscopy study of homophilic JAM-A interactions and JAM-A interactions with reovirus attachment protein sigma1*. Journal of molecular recognition : JMR, 2008. **21**(4): p. 210-6.
83. Lopez, T., et al., *Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system*. Journal of virology, 2011. **85**(22): p. 11964-71.
84. Pasqual, G., et al., *Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport*. PLoS pathogens, 2011. **7**(9): p. e1002232.
85. Boisvert, M., S. Fernandes, and P. Tijssen, *Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus*. Journal of virology, 2010. **84**(15): p. 7782-92.
86. Wang, Q., et al., *Interactions of SARS coronavirus nucleocapsid protein with the host cell proteasome subunit p42*. Virology journal, 2010. **7**: p. 99.
87. Gotoh, B., et al., *Paramyxovirus strategies for evading the interferon response*. Reviews in medical virology, 2002. **12**(6): p. 337-57.
88. Neznanov, N., et al., *Different effect of proteasome inhibition on vesicular stomatitis virus and poliovirus replication*. PloS one, 2008. **3**(4): p. e1887.
89. Schubert, U., et al., *Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(24): p. 13057-62.
90. Isomura, M., et al., *Isolation and mapping of RAB2L, a human cDNA that encodes a protein homologous to RaIGDS*. Cytogenetics and cell genetics, 1996. **74**(4): p. 263-5.
91. Kelly, E.E., et al., *Rab30 is required for the morphological integrity of the Golgi apparatus*. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization, 2012. **104**(2): p. 84-101.
92. Brandizzi, F. and C. Barlowe, *Organization of the ER-Golgi interface for*

- membrane traffic control*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2013. **14**(6): p. 382-92.
93. Martin-Serrano, J. and S.J. Neil, *Host factors involved in retroviral budding and release*. Nature reviews. Microbiology, 2011. **9**(7): p. 519-31.
94. Meng, B. and A.M. Lever, *Wrapping up the bad news: HIV assembly and release*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 5.
95. Karjalainen, M., et al., *Echovirus 1 infection depends on biogenesis of novel multivesicular bodies*. Cellular microbiology, 2011. **13**(12): p. 1975-95.
96. Mizuno-Yamasaki, E., F. Rivera-Molina, and P. Novick, *GTPase networks in membrane traffic*. Annual review of biochemistry, 2012. **81**: p. 637-59.
97. Stenmark, H., *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2009. **10**(8): p. 513-25.