



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

**“IDENTIFICACIÓN DE FACTORES QUE INTERACCIONAN CON VP1 DE  
MANERA DEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**Lic. en C. JOAQUÍN MORENO CONTRERAS**

**DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ  
TUTOR PRINCIPAL  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**

**DRA. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM**

**DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**CUERNAVACA, MORELOS.**

**MAYO, 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.



Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. En el departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el laboratorio del Dr. Carlos F. Arias y la Dra. Susana López, bajo la dirección del Dr. Tomás David López Díaz. Durante la realización de este trabajo se conto con el apoyo SEP-CONACYT #153639 y con los donativos DGAPA-UNAM IN212211-3, IN207714 y IG200114.

*Dedicatoria.*

*Este trabajo está dedicado a mis padres, Eliseo Moreno y Miguelina Contreras; a mis hermanos Carlos y Geovani y a mi sobrino Juan Francisco.*

## Agradecimientos

Al Dr. Tomás López por todas sus enseñanzas, apoyo, dedicación, empeño y tiempo, los cuales han sido de gran importancia durante mi formación académica.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Laura Alicia Palomares y la Dra. Rosa María del Ángel Núñez, por todas las críticas y recomendaciones realizadas durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi jurado, Dra. Carmen Beltrán, Dra. Isabel Gómez, Dra. Victoria Pando, Dr. Gustavo Pedraza y Dr. Ernesto Ortiz, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A mis padres, por toda su comprensión y cariño.

Al Dr. Carlos F. Arias y la Dra. Susana López por permitirme estar en su laboratorio, así como a todos los integrantes del laboratorio CA/SL.

A Rafaela Espinoza por su valioso apoyo técnico.

A la memoria de Pedro Romero, por todo su apoyo técnico y su gran amistad. Siempre lo recordaré con mucho cariño.

A Marco Antonio y Neftaly por brindarme su amistad, por todos los consejos y por haber hecho este camino más llevadero.

A Joaquín Ramírez por haberme apoyado de manera especial cuando lo requería, por tener en el a un amigo incondicional y por ser un compañero de aventuras.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

## INDICE

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
GENERALIDADES	6
CLASIFICACIÓN	8
GENOMA	8
ESTRUCTURA DE ROTAVIRUS	9
FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES	11
CICLO REPLICATIVO	16
ANTECEDENTES	20
VIROPLASMAS	20
INTERACCIONES CON FACTORES CELULARES	21
LA POLIMERASA VIRAL VP1	23
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28

RESULTADOS	35
GENERACIÓN DE LA CLONA HIS-VP1	35
UNIÓN COVALENTE DEL SUERO AVP1 A LA PROTEÍNA A-SEFAROSA.	43
EL SUERO AVP1 NO INMUNOPRECIPITA DLPS Y TLPS	44
LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE VP1 ES ESPECÍFICA DEL SUERO UTILIZADO.	45
CLARIFICACIÓN DE LISADOS CELULARES	47
INMUNOPRECIPITACIONES REALIZADAS CON DIFERENTES CANTIDADES DE LISADO	48
INMUNOPRECIPITACIONES DE LISADOS DE CÉLULAS INFECTADAS Y TRATADAS CON MG132.	49
CONCLUSIONES	59
ANEXO I	60
ANEXO II	60
ANEXO III	61
ANEXO IV	64
REFERENCIAS	65

## Abreviaturas

B-TrCP: Proteína con repeticiones de transducina- $\beta$ .

cbp: Cuanto baste para.

CHOP: Proteína de unión al potenciador CCAT.

CIP: Fosfatasa alcalina de cabra.

DLP: Partícula de doble capa.

DMP: Dimetilpimelidato.

dsRNA: RNA de doble cadena.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

eIF: Factor de inicio de la traducción eucariótico.

FRET: Transferencia de energía resonante de Förster.

Ig: Inmunoglobulina.

IP: Inmunoprecipitación.

IRF: Factor regulador de interferón.

hpi: Horas post infección.

LB: Luria Bertani.

MOI: Multiplicidad de infección.

mRNA: RNA mensajero.

NSP: Proteína no estructural.

OAS: Oligoadenilato sintetasa.

PABP: Proteína de unión a la cola poli A.

PBS: Amortiguador de fosfatos salino.

PERK: Kinasa del retículo endoplasmático parecida a PKR.

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa.

RE: Retículo endoplasmático.

RRV: Rotavirus del mono *Rhesus*.



SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SFB: Suero fetal bovino.

siRNA: RNA pequeño de interferencia.

ssRNA: RNA de cadena sencilla.

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción.

TA: Temperatura ambiente.

TLP: Partícula de triple capa.

TRAF: Factor asociado al receptor TNF.

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas.

VLS: Estructuras parecidas a viroplasmos.

VP: Proteína viral.

## Lista de figuras

Figura 1: Representación esquemática de rotavirus.

Figura 2: Ciclo replicativo de rotavirus.

Figura 3: La inhibición del proteasoma causa la pérdida de asociación de la proteína VP1 a viroplasmos.

Figura 4: El plásmido pGEM3Z-VP1 contiene la secuencia que codifica para la proteína VP1.

Figura 5: Estandarización de las condiciones de la reacción de PCR.

Figura 6: La clonación de VP1 no se logró realizar utilizando la cepa de *E. coli* JM101.

Figura 7: La clonación de VP1 en la cepa de *E. coli* XL1-BLUE generó falsos positivos.

Figura 8: La clonación de VP1 en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  generó falsos positivos.

Figura 9: El suero policlonal  $\alpha$ VP1 puede ser utilizado para realizar los ensayos de inmunoprecipitación.

Figura 10: Determinación de la cantidad óptima del suero  $\alpha$ VP1 para realizar los ensayos de inmunoprecipitación.

Figura 11: La unión covalente del suero  $\alpha$ VP1 a la proteína A-sefarosa reduce la detección de las inmunoglobulinas.

Figura 12: El suero  $\alpha$ VP1 no inmunoprecipita TLPs ni DLPs.

Figura 13: La inmunoprecipitación de VP1 es específica del suero utilizado.

Figura 14: Estandarización del tiempo de clarificado de los lisados.

Figura 15: Estandarización de la cantidad óptima de lisado para realizar las inmunoprecipitaciones.

Figura 16: La inhibición del proteasoma no afecta la síntesis de VP1.

Figura 17: La inhibición del proteasoma no afecta la inmunoprecipitación de VP1.

Figura 18. La interacción entre NSP5 y VP1 no se afecta cuando se inhibe el proteasoma.

Figura 19. La interacción entre NSP2 y VP1 se afecta cuando se inhibe el proteasoma.

## RESUMEN

Los rotavirus son el principal agente viral causante de gastroenteritis en niños menores de 5 años. En estudios en cultivo celular se demostró que la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma, utilizando el inhibidor MG132, provoca una disminución en la producción de progenie viral, sin que afecte la producción de proteína viral. También hay una disminución en el tamaño y un incremento en el número de los viroplasma, los cuales funcionan como centros replicativos del rotavirus. Bajo esta condición hay una pérdida de la localización de la polimerasa viral VP1, la cual cambia su patrón de distribución de viroplasma a citoplasma.

Este cambio de distribución puede ser debido a que en condiciones en las que se inhibe el proteasoma, hay un cambio en las interacciones entre VP1 y proteínas celulares o virales que están involucradas en la localización de VP1 a los viroplasma.

En el presente trabajo se realizaron ensayos de inmunoprecipitación contra VP1 para analizar las posibles interacciones de esta proteína con proteínas celulares o virales, las cuales fueran dependientes de la actividad del proteasoma. Aunque, bajo nuestras condiciones experimentales no encontramos que VP1 interactúa con proteínas celulares, encontramos que la inhibición del proteasoma provoca una pérdida de la interacción entre VP1 y NSP2 no así con NSP5, lo cual podría explicar la pérdida de asociación de VP1 a los viroplasma.

# Introducción

## Generalidades

Los rotavirus son un género de la familia *Reoviridae*, una de las siete familias de virus de RNA de doble cadena (dsRNA). La familia *Reoviridae* es la más grande y diversa ya que tiene un amplio rango de hospederos. Su genoma puede tener de 10-12 segmentos de dsRNA; cada uno codifica de una a tres proteínas. Forman viriones que miden de 75 a 100 nm, no tienen envoltura lipídica y sus proteínas están arregladas en forma concéntrica con una simetría icosaédrica<sup>1</sup>. Durante la replicación, el genoma viral es transcrito a RNA mensajero (mRNA), el cual es utilizado para la síntesis de proteínas estructurales y no estructurales. Estos virus transcriben los segmentos de dsRNA de manera simultánea y repetida dentro de la cápside intacta, en un proceso conocido como transcripción endógena<sup>2</sup>.

Los rotavirus son el principal agente causal de diarrea severa en niños menores de 5 años. Se estima que causa cada año alrededor de 400,000 a 600,000 muertes, 2 millones de hospitalizaciones, 25 millones de visitas médicas y 111 millones de casos de gastroenteritis en el mundo. La mayoría de las muertes ocurren en países en vías de desarrollo, al parecer la buena higiene y sanitización no parecen reducir la prevalencia o prevenir las infecciones causadas por rotavirus<sup>3</sup>.

La población más susceptible a ser infectada por rotavirus son niños de entre 9 y 23 meses de edad. Los síntomas de la infección se manifiestan 1 ó 2 días

después de la infección y llegan a durar hasta una semana. Entre los síntomas se encuentran vómito, fiebre y diarrea crónica la cual provoca deshidratación<sup>4</sup>.

El tropismo de rotavirus *in vivo* está restringido a los enterocitos presentes en la punta de las microvellosidades del intestino delgado, aunque también puede infectar tejidos extraintestinales<sup>5</sup>. En diversos modelos animales se ha reportado que la infección provoca lesiones débiles, tales como la formación de vacuolas en los enterocitos, la descamación de los villi e hiperplasia de las células de la cripta<sup>6,1,7</sup>. Los rotavirus son transmitidos comúnmente por la ruta fecal-oral, aunque hay evidencia que sugiere que puede ser transmitida mediante fluidos respiratorios, contacto persona-persona y mediante el contacto con superficies contaminadas<sup>4</sup>.

La diarrea causada por rotavirus es multifactorial. Algunos reportes sugieren que la diarrea es causada por una combinación de daños en los mecanismos osmóticos y secretores. Estos daños están relacionados directamente con la presencia de la proteína no estructural NSP4, la cual induce un incremento en la concentración de calcio en las células de la cripta, provocando la liberación de cloro. Además NSP4 está asociada a la pérdida de las uniones estrechas entre los enterocitos y a la pérdida de la barrera de permeabilidad paracelular, teniendo como resultado un desequilibrio en el balance iónico, lo que provoca la salida de agua. También la estimulación del sistema nervioso entérico está relacionada con el desarrollo de diarrea aunque el mecanismo no se conoce con detalle<sup>6,8,1</sup>. El conocimiento de las vías por las cuales se induce la diarrea, podría ayudar a la generación de nuevas estrategias para controlar con mayor eficiencia este efecto y la consecuente deshidratación.

## **Clasificación**

El género rotavirus está clasificado serológicamente en 7 grupos (A-G), de los cuales solamente los grupos A, B y C infectan a humanos y animales, mientras que los otros grupos solo se han detectado en animales. Los rotavirus del grupo A son los más estudiados, ya que son de mayor importancia tanto médica como veterinaria. La serotipificación de rotavirus es binaria y está basada en las diferencias antigénicas de las proteínas VP4 y VP7, las cuales proveen la base para la clasificación de cepas en serotipos G (Glicoproteína, VP7) y P (Sensible a proteasa, VP4), aunque recientemente se ha reportado un nuevo sistema de clasificación basado en sus 11 segmentos de dsRNA<sup>9</sup>. La designación del serotipo G es la misma que la clasificación del genotipo G, sin embargo la clasificación del serotipo VP4 y genotipo VP4, muestran una nomenclatura dual<sup>1</sup>. A la fecha hay 16 genotipos G y 27 genotipos P, de los cuales 11 genotipos G y 12 P han sido aislados de humanos<sup>3</sup>.

Estudios epidemiológicos muestran que cinco genotipos de rotavirus (G1P [8], G3P [8], G4P [8], G2P [4] y G9P [8]) han sido los más comunes durante los últimos 20 años en el mundo, siendo el genotipo G1P [8] el más predominante, en países desarrollados como Estados Unidos, Reino Unido y Australia, así como en países en vías de desarrollo de América Latina<sup>10</sup>.

## **Genoma**

El genoma de rotavirus está formado por 11 segmentos dsRNA, los cuales pueden tener de 650 a 3,300 pares de bases. El genoma viral codifica para 12 proteínas, 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) y 6

proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (Figura 1A). Los 11 segmentos presentan secuencias conservadas, cada segmento de RNA de sentido positivo presenta las mismas características que un RNA mensajero celular, con excepción de la cola poli A en el extremo 3'. Dentro de la región no traducida 3' se encuentra una secuencia a la cual se une la proteína no estructural NSP3. Dentro de la secuencia de los mensajeros existen señales las cuales son importantes para su expresión, así como para la replicación del genoma. La mayoría de los genes codifican para una proteína, solamente el segmento 11 codifica para dos proteínas las cuales son NSP5 y NSP6. El RNA viral puede ser utilizado para la expresión de proteínas y para la síntesis de dsRNA, el cual es utilizado en la formación de nuevas partículas virales<sup>1</sup>. El poseer un genoma segmentado, le permite al rotavirus generar cepas rearreglantes cuando una célula es infectada por dos cepas diferentes, aunque estos rearreglantes solo se pueden generar entre virus que pertenecen al mismo grupo. Esta propiedad tiene el potencial de generar muchas combinaciones entre las proteínas VP7 y VP4, y por consiguiente crear una mayor diversidad de serotipos<sup>3,4</sup>.

## **Estructura de rotavirus**

El virión maduro de rotavirus tiene un diámetro aproximado de 70 a 100 nm. Estructuralmente está conformado por tres capas concéntricas de proteínas, las cuales son: nucleocápside, capa intermedia y capa externa, que juntas forman una estructura icosaédrica que carece de envoltura lipídica (Figura 1B)<sup>1</sup>.



Existen tres intermediarios de replicación con diferentes características estructurales y funcionales. El core o núcleo viral, que encierra al genoma, está formada por VP2 y pequeñas cantidades de VP1 y VP3. Estas tres proteínas forman el complejo enzimático de transcripción.

La partícula que contiene dos capas de proteínas (DLP), está formada por las proteínas que conforman el core más una capa de la proteína VP6, esta partícula tiene la capacidad de ser transcripcionalmente activa <sup>2</sup>. La proteína VP6 es la más abundante dentro del virión y es el inmunógeno dominante <sup>11</sup>.

La partícula de tres capas o TLP (Figura 1C), es la partícula madura e infecciosa de rotavirus ya que en su capa externa tiene a las proteínas VP7 y VP4, las cuales tienen funciones durante la unión al receptor y la penetración a la célula huésped, por lo que es importante para la determinación del tropismo y virulencia <sup>12,5</sup>.

Debido a que el calcio es importante para la estabilidad de VP7, el tratamiento con agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  como el EGTA, hacen que la TLP pierda su integridad, provocando la pérdida de la capa externa obteniendo así una DLP<sup>13</sup>. Esta forma inmadura no puede ingresar a la célula, pero cuando es transfectada produce un ciclo de replicación normal <sup>13,1</sup>.

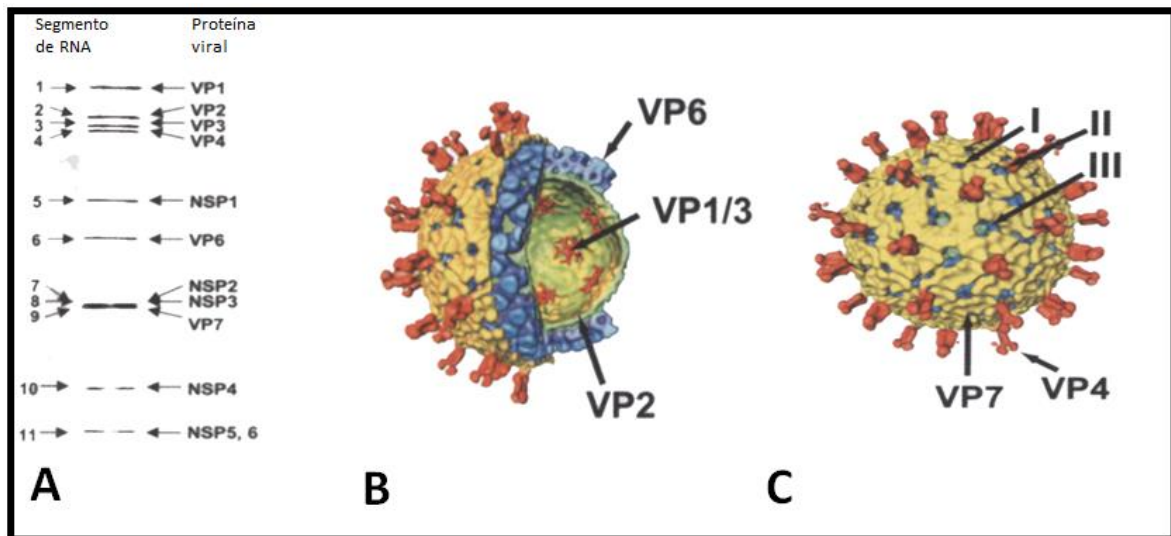


Figura 1. Representación esquemática de Rotavirus. A) Se muestra el patrón electroforético de los 11 segmentos de dsRNA del genoma viral, así como las proteínas para las que codifican. B) Representación del núcleo o core conformado por las proteínas VP1, VP2, VP3, la capa intermedia formada por VP6 y la capa externa formada por VP7 y VP4. C) Representación de la estructura de un virión maduro, en donde se muestra la capa externa formada por VP7 (amarillo) y VP4 (rojo), así como los tipos de canales presentes en la estructura. Modificada de Jarayam *et al* 2004.

## **Función de las proteínas estructurales y no estructurales**

El genoma de rotavirus codifica seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6). Como su nombre lo indica, las proteínas estructurales forman parte del virión, mientras que las proteínas no estructurales son sintetizadas en el transcurso de la infección y tienen diversas funciones durante el ciclo de replicación como son: síntesis de proteínas, morfogénesis y evasión de la respuesta inmune del hospedero<sup>14.1</sup>.

La numeración presentada aquí en cuanto al gen y su producto, está realizada tomando como referencia a la cepa RRV, ya que dependiendo de la cepa esta numeración cambia.

VP1, codificada por el gen 1, es la polimerasa viral ya que presenta actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, sin embargo para que VP1 tenga esta actividad es necesario que interaccione con VP2<sup>15</sup>.

VP2, es codificada por el gen 2, forma la capa interna del virión en el cual hay 60 dímeros, tiene la capacidad de estimular a la RNA polimerasa viral, en la partícula viral interacciona con VP1, VP3 y VP6<sup>1</sup>. Además esta proteína tiene la capacidad de inducir la formación de estructuras parecidas a viroplasmos (VLS) cuando se expresa con NSP5<sup>16</sup>.

VP3, codificada por el gen 3, presenta actividad de guanilil-metil-transferasa adicionando el CAP en el extremo 5' de los mensajeros<sup>17</sup>. Además de esta función Rong Zhang y colaboradores reportaron que VP3 posee actividad de 2'-5' fosfodiesterasa, importante para que rotavirus evada la respuesta inmune innata al inhibir el sistema 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5' OAS) ribonucleasa (RNasa) L<sup>18</sup>.

VP4, es codificada por el gen 4. De esta proteína se encuentran 60 espículas presentes en la capa externa del virión. Es importante durante el proceso de entrada ya que reconoce a los receptores presentes en la membrana celular. Para que la partícula sea infecciosa, VP4 tiene que ser cortada proteolíticamente por tripsina, esto permite la generación de dos segmentos conocidos como VP5 y VP8\*<sup>1</sup>.

VP6, codificada por el gen 6, es el componente de la capa intermedia del virión. De esta proteína hay 260 trímeros, siendo la proteína más abundante del virión. VP6 interacciona dentro del virión con VP2, VP7 y VP4<sup>1</sup>, funcionando como un adaptador para las proteínas de capa externa del virión<sup>19</sup>

VP7, codificada por el gen 9, es una glicoproteína que se encuentra en el lumen del RE. Esta glicoproteína une calcio y forma la parte lisa de la superficie del virión en la cual hay 260 trímeros. Es importante durante el proceso de entrada del virus a la célula ya que reconoce a una serie de integrinas presentes en la membrana de la célula hospedera<sup>1</sup>.

NSP1, codificada por el gen 5, es la proteína menos conservada entre los rotavirus, tiene una secuencia conservada rica en cisteínas, presenta actividad de unión a RNA y citoesqueleto<sup>20</sup>. Estudios recientes han reportado que esta proteína puede regular la apoptosis, ya que durante las primeras horas de infección activa vías de sobrevivencia (PI3K/Akt, NF-κB), al inhibir la apoptosis prematura de la célula hospedera se incrementa la producción de virus<sup>21</sup>. Además NSP1 está implicada en la evasión de la respuesta inmune innata del hospedero ya que envía a degradación mediada por proteasoma a IRF3, IRF7, IRF5, β-TrCP y TRAF2<sup>22,23,24</sup>. También puede interactuar con la proteína celular RIGI provocando su disminución a través de un mecanismo independiente del proteasoma<sup>25</sup>. Adicionalmente puede inhibir la translocación al núcleo de STAT1, STAT2 y NFκB regulando de esta manera la inducción de interferón tipo I y II<sup>26,27</sup>.

La proteína NSP2, codificada por el gen 8, es una proteína altamente conservada. Esta proteína forma octámeros con forma de dona, los cuales unen RNA de cadena sencilla (ssRNA). Presenta actividad de helicasa dependiente de Mg<sup>2+</sup> y ATP, así como actividad de NTPasa. La actividad de NTPasa es necesaria para la síntesis de dsRNA pero no es necesaria para la formación de los viroplasma<sup>28</sup>. Existen dos poblaciones de NSP2, una

localizada en los viroplasmos y otra difusa en el citoplasma, de esta última no se conoce aún su función<sup>29</sup>.

NSP3 es codificada por el gen 9. Esta proteína interactúa con el factor de inicio de la traducción eucariótico eIF-4GI desplazando a las proteínas de unión a la cola poli-A (PABP) de la maquinaria de traducción. El dominio amino terminal de esta proteína interactúa con la secuencia consenso 5'-UGACC-3' presente en los mRNAs virales<sup>30</sup>. Se creía que la interacción entre NSP3 y eIF-4GI incrementaba la síntesis de proteínas virales, sin embargo estudios recientes (en los cuales se inhibió la expresión de NSP3 con RNA de interferencia (siRNA)), demuestran que esta interacción no es importante para que la traducción de los mensajeros virales se lleve a cabo, ya que cuando no se expresa NSP3, contrario a lo esperado, no disminuye la síntesis de proteína viral<sup>31</sup>. Los rotavirus inducen en el retículo endoplasmático la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), esta respuesta es regulada por la proteína NSP3 ya que inhibe la traducción de las proteínas efectoras implicadas en esta vía<sup>32</sup>.

NSP4, proteína codificada por el gen 10, es una glicoproteína transmembranal del RE, la cual tiene el amino terminal orientado hacia el lumen del retículo y el extremo carboxilo terminal hacia el lado citoplasmático<sup>33</sup>. Fue la primera enterotoxina viral descrita, presenta funciones en la patogenicidad y en la morfogénesis de rotavirus. NSP4 incrementa los niveles intracelulares de calcio a través de una vía independiente de la fosfolipasa C<sup>8</sup>. Presenta un dominio de 43 aminoácidos el cual se inserta en la membrana del retículo endoplasmático funcionando como una viroporina la cual provoca la liberación de calcio al medio extracelular provocando un desbalance iónico<sup>34</sup>. Esta proteína regula el

ensamblado de partículas infecciosas, modulando el tráfico de membranas a través de la activación del proceso de autofagia, las proteínas NSP4, VP7 y LC3 (marcador de autofagosomas) se encuentran en membranas que rodean a los viroplasmos. Se ha propuesto que durante la morfogénesis, NSP4 interacciona con las partículas inmaduras (DLPs) en la interface entre los viroplasmos y las membranas con LC3 y NSP4, NSP4 se une a las DLPs provocando la gemación a través de estas membranas para facilitar el proceso de ensamblado de las proteínas de capa externa generando viriones maduros<sup>35,36,37</sup>. Además de interactuar con VP4 y VP7 puede interactuar con VP6, esta interacción podría ser importante para que la gemación se lleve a cabo<sup>38</sup>.

NSP5, codificada por el gen 11, es una fosfoproteína ácida que es O-glicosilada y tiene un gran número de residuos de serina en su extremo carboxilo terminal. Esta proteína forma dímeros y puede estar hiper o hipo fosforilada<sup>14</sup>, también puede unir dsRNA o ssRNA. Tanto NSP2 como VP2 pueden inducir la fosforilación de NSP5 en ausencia de otras proteínas virales, aunque el mecanismo no está del todo claro<sup>39</sup>. NSP5 tiene un papel preponderante durante la formación de los viroplasmos el cual será detallado en secciones posteriores.

La proteína NSP6 al igual que NSP5, es codificada por el gen 11. Es la proteína de la cual menos información se tiene. Su función es desconocida, se localiza en los viroplasmos y puede interactuar con el carboxilo terminal de NSP5. Dado que esta región es la necesaria para que NSP5 pueda formar dímeros, NSP6 podría estar involucrada en este proceso<sup>16,14</sup>.

La función de las proteínas NSP2 y NSP5 será abordada con mayor detalle en secciones posteriores.

## **Ciclo replicativo**

Los rotavirus infectan a los enterocitos presentes en las puntas de las microvellosidades del intestino delgado. Sin embargo, nuestro conocimiento acerca del modo de infección es derivado de estudios principalmente *in vitro* en la línea celular de riñón de mono verde MA104, aunque también se han realizado estudios en líneas celulares derivadas de colon. Este modelo de estudio ha sido de gran ayuda para elucidar el ciclo replicativo de los rotavirus. La replicación en cultivos celulares continuos de MA104 es muy rápida, con una producción máxima de virus entre las 10 y 12 horas post infección (hpi) a 37°C<sup>1</sup>.

Para que los rotavirus ingresen eficientemente a su célula hospedera, la proteína de capa externa VP4 tiene que ser cortada proteolíticamente por tripsina, para generar los fragmentos VP5\* y VP8\*. Estos fragmentos interaccionan con receptores específicos en la membrana celular, permitiendo la entrada del virus a la célula. VP8\* interacciona con ácido siálico. Existen cepas, como RRV, en las que el tratamiento con neuraminidasa afecta el proceso de entrada del virus a la célula (conocidas como sensibles a neuraminidasa). Por otra parte en cepas como UK, el tratamiento con neuraminidasa no afecta la entrada (conocidas como insensibles a neuraminidasa). Las cepas insensibles a neuraminidasa se unen a ácidos siálicos internos, como los presentes en algunos gangliósidos, los cuales son resistentes a neuraminidasa<sup>40</sup>. Estudios recientes indican que además de los

ácidos siálicos la mayoría de las cepas de rotavirus humanos reconocen glicanos del grupo sanguíneo<sup>41</sup>.

Las proteínas VP5\* y VP7 interactúan con una serie de integrinas y hsc70. Todos los receptores se encuentran en balsas lipídicas (lipid rafts) sobre la superficie de la membrana celular<sup>5</sup>.

Los rotavirus ingresan a la célula (Figura 2) mediante endocitosis mediada por clatrina<sup>42</sup>, a excepción de RRV el cual ingresa a través de una ruta endocítica independiente de clatrina y de caveolina pero dependiente de la GTPasa dinamina<sup>43</sup>. Durante la entrada, el virión pierde las proteínas externas VP7 y VP4, dando lugar a la formación de una DLP la cual es transcripcionalmente activa. La replicación del genoma del rotavirus ocurre en el citoplasma mediante la acción de las propias enzimas virales, ya que la célula huésped carece de enzimas capaces de realizar esta función<sup>1</sup>.

El RNA (+) viral funciona para la síntesis de proteínas y para la producción de dsRNA. La replicación del genoma viral, la formación del núcleo viral (core) y la formación de las DLPs, se realizan dentro de inclusiones citoplasmáticas llamadas viroplasmos. La caracterización de intermediarios de replicación ha sido de gran importancia para la comprensión de cómo se forman estos núcleos virales. Se han identificado tres intermediarios de replicación. El primero de ellos está formado por las proteínas VP3 y VP1, y no posee la capacidad de replicar RNA viral; el segundo está formado por las proteínas VP1, VP2 y VP3, el cual posee la capacidad de llevar a cabo la replicación de RNA; por último se encuentra el intermediario formado por VP1, VP2, VP3 y VP6<sup>44</sup>.



Una vez que se ha formado la DLP, ésta gema hacia membranas autofagosómicas provenientes del retículo endoplasmático, durante este paso adquiere una membrana transitoria de lípidos, la cual posteriormente es eliminada, para así obtener una partícula viral madura e infecciosa (TLP). Una vez formados los nuevos viriones pueden ser liberados mediante lisis celular<sup>1</sup> (Figura 2), aunque en células polarizadas la salida es mediante un transporte vesicular no convencional, el cual va del retículo endoplasmático a la membrana plasmática apical evitando el aparato de Golgi y los lisosomas. Mediante este último mecanismo no hay lisis celular<sup>45</sup>.

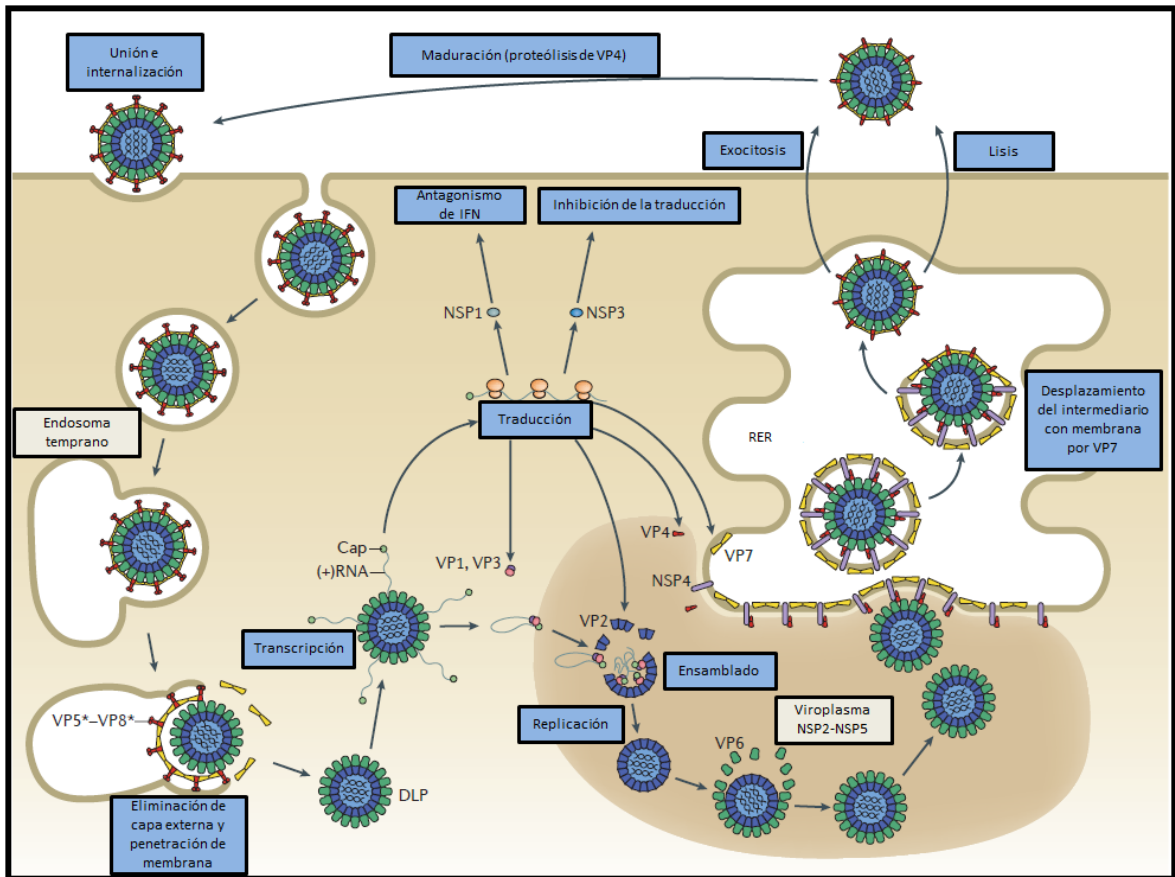


Figura 2. Ciclo replicativo de rotavirus. El primer paso es la unión del virión de rotavirus a la célula hospedera; muchas cepas se unen a los ácidos siálicos presentes en la superficie de la célula. El virión entra a la célula mediante endocitosis y se libera en los endosomas, donde las proteínas de capa externa VP4 y VP7 son eliminadas. Posteriormente la partícula de doble capa (DLP) es liberada en el citoplasma, donde se lleva a cabo la transcripción del genoma viral para generar el RNA (+), el cual sirve como mRNA para la síntesis de proteínas virales y como templado para generar dsRNA. La traducción de las proteínas virales se lleva a cabo en el citoplasma. El ensamblado de las DLPs se lleva a cabo en los viroplasmos. Para que la DLP madure tiene que gemar hacia el retículo endoplasmático rugoso, durante este paso la DLP adquiere una membrana transitoria de lípidos la cual es eliminada por VP7. El proceso de maduración termina con la incorporación de VP4 y VP7. Finalmente el virión sale mediante lisis celular. Modificada de Trask D. Shane *et al* 2012.

## Antecedentes

### Viroplasmias

Los centros replicativos de los rotavirus son los viroplasmias, los cuales están formados por las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6 y por las proteínas no estructurales NSP5 y NSP2<sup>46</sup>. Existen diversos estudios en los cuales se ha caracterizado la formación de viroplasmias. Estas estructuras comienzan a aparecer entre las 2-3 hpi y su tamaño y número se incrementa durante la infección<sup>47</sup>. Se ha reportado que NSP5 es la proteína formadora de viroplasmias y que su actividad, así como su estado de fosforilación es modulado por las proteínas NSP2 y VP2, ya que la expresión de NSP5-VP2 o NSP5-NSP2 induce a la formación de VLS<sup>48,16</sup>. La región de interacción entre NSP2 y NSP5 se encuentran en el amino terminal de NSP5<sup>49</sup>.

La proteína NSP5 está involucrada en el proceso de reclutamiento de las proteínas presentes en los viroplasmias. NSP5 se hiperfosforila cuando interacciona con la proteína NSP2 o VP2, sin embargo este evento no es necesario para que se formen los viroplasmias. También se ha reportado que la proteína VP1 inhibe de alguna manera no caracterizada el proceso de hiperfosforilación de NSP5<sup>50</sup>.

La proteína NSP2 no es solo importante para la generación de viroplasmias, también coordinar el empaquetado del genoma, la replicación y el ensamblado de partículas virales<sup>28,14</sup>.

## Interacciones con factores celulares

Además de las proteínas virales, se ha reportado la existencia de factores celulares que ayudan a la formación de los viroplasmos. Tal es el caso de los organelos celulares conocidos como gotas lipídicas, los cuales además de estar asociados al metabolismo de lípidos y carbohidratos, son importantes durante las etapas tardías de la formación de viroplasmos. La génesis de los viroplasmos se lleva a cabo de manera independiente a las gotas lipídicas. No es sino hasta las 4 hpi cuando se comienza a observar la presencia de perilipina A en los viroplasmos, ya que hay una colocalización entre ésta y las proteínas virales presentes en los viroplasmos. Mediante ensayos de FRET se demostró la interacción entre NSP5 y perilipina A. La inhibición de la formación de las gotas lipídicas afecta la formación de viroplasmos y la producción de progenie viral <sup>51</sup>.

Los lípidos tienen una función relevante durante el ciclo de replicación de rotavirus, Yunjeong y colaboradores demostraron la importancia de la homeostasis de los lípidos en la replicación de rotavirus. La infección de rotavirus causa un incremento en la cantidad de triglicéridos, los cuales son componentes de gotas lipídicas, mientras que la reducción de la cantidad de lípidos celulares disminuye la producción de progenie viral <sup>52,53</sup>.

Además de perilipina A, Zambrano y colaboradores *et al 2011*, reportaron que tras la infección de rotavirus se induce un cambio en el patrón de distribución de una serie de factores involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas (PERK, CHOP y GADD34), las cuales tras la infección co-localizan con los viroplasmos <sup>54</sup>. También se ha reportado que NFκB, un factor

involucrado en la activación de genes relacionados a la respuesta inmune innata, es encontrado en los viroplasmos<sup>55</sup>. Esto sugiere que los viroplasmos, además de funcionar como centros replicativos, se encargan de regular la localización de proteínas celulares que pueden encender vías que afectan su ciclo replicativo.

Tras la infección con rotavirus la red de microtúbulos, los cuales son componentes del citoesqueleto, es remodelada. Rotavirus induce la formación de gránulos de tubulina, estos gránulos colocalizan con los viroplasmos. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se demostró que la tubulina interacciona con NSP2, esta interacción induce la despolimerización de los microtúbulos permitiendo la formación de los gránulos. Este mecanismo podría ayudar al virus a afectar el tráfico celular, inhibiendo funciones involucradas en la defensa contra infecciones virales<sup>56</sup>.

Si bien se conocen algunos factores celulares que tras la infección de rotavirus son relocalizados, en la mayoría de los casos se desconoce el mecanismo o las proteínas encargadas de reclutarlos. Además, no se sabe si adicionalmente a éstos hay otros factores, los cuales no han sido identificados y que podrían ser importantes para la formación de estas estructuras, así como para el proceso de generación de partículas virales infecciosas.

## La polimerasa viral VP1

La proteína estructural VP1 cumple la función de RNA polimerasa dependiente de RNA. Está codificada por un mRNA de 3302 pares de bases que produce una proteína de 125 kDa.

Se conoce la estructura cristalográfica de esta proteína. La información que proporciona permitió la caracterización de los dominios presentes en la proteína así como la identificación de regiones importantes para la interacción entre ésta y el RNA (+). La unión permite la síntesis de la cadena RNA (-) y la consecuente formación del dsRNA. El tetranucleótido UGUG presente en la secuencia consenso (3' CS+: 5'-UGUGACC-3') del RNA (+) sirve para que sea reconocido por VP1, mientras que el segmento terminal ACC es importante para iniciar la síntesis de la cadena RNA <sup>57</sup>.

Entre las interacciones más importantes que presenta la VP1 se encuentra la que tiene con VP2. Se ha reportado que la interacción entre VP1 y el amino terminal de VP2 es importante para que VP1 sea encapsidada en las partículas virales en formación<sup>58</sup>. Esta interacción también es importante para encender la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, lo cual permite la generación de dsRNA a partir de los templados de RNA (+)<sup>59</sup>. Además de esta interacción, se sabe que la proteína VP1 también interacciona en los viroplasmas con NSP5, NSP2 y VP3<sup>50</sup>.

Recientemente López y colaboradores *et al* 2011 reportaron que la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma tiene como efecto, entre otras cosas, un incremento del número de viroplasmas y una disminución en su tamaño, además de la pérdida de asociación de la proteína VP1 a estas estructuras<sup>60</sup>

(Figura 3). Una posible explicación podría ser que la proteína VP1 está interactuando con alguna(s) proteína(s) celular(es), y que estas interacciones fueran necesarias para la localización de VP1 a los viroplasmos, probablemente estas interacciones podrían estar modificándose en condiciones en las que se inhibe el proteasoma. También queda la posibilidad de que la inhibición del proteasoma genere nuevas interacciones, teniendo como consecuencia el mismo resultado. Dado que VP1 interactúa con proteínas virales en los viroplasmos cabe la posibilidad de que la pérdida de asociación de VP1 a los viroplasmos sea dada debido a un cambio en las interacciones con estas proteínas. La actividad proteasomal es importante para el recambio de proteínas presentes en las gotas lipídicas durante su proceso de maduración<sup>61</sup>, y dado que los viroplasmos están asociados a gotas lipídicas, el proteasoma podría estar teniendo un papel relevante sobre la regulación de factores celulares o virales que se asocian a los viroplasmos.

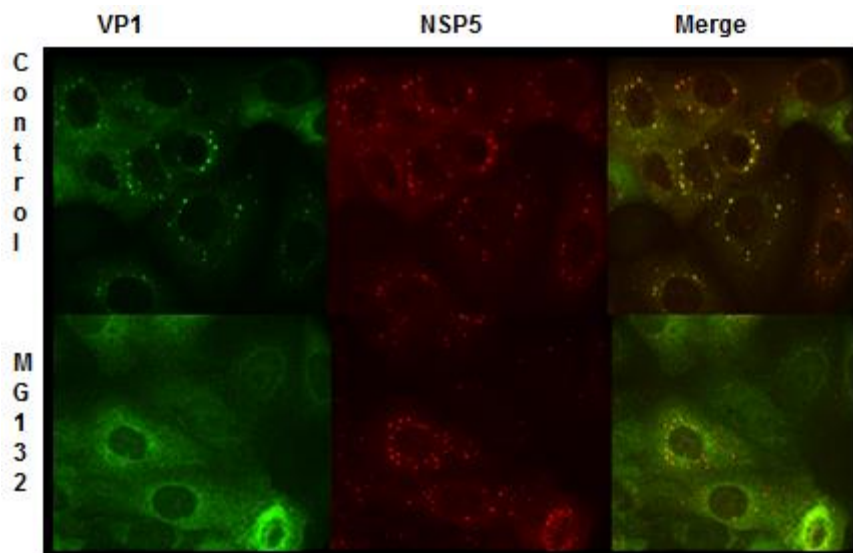


Figura 3. La inhibición del proteasoma causa la pérdida de asociación de la proteína VP1 a viroplasmos. Células MA104 infectadas con RRV a una MOI de 1 cosechadas a 8 hpi. Panel superior control, panel inferior células MA104 tratadas con 10 $\mu$ M de MG132. Se muestra a VP1 (verde) y NSP5 (rojo). Tomado de López *et al* 2011.

## **Justificación**

Los viroplasmatas son los centros replicativos de rotavirus, en ellos se lleva a cabo la replicación del RNA viral y la formación de las DLPs. Estas estructuras comienzan a aparecer después de las 2-3 hpi, están formadas por las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP6 y por las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5. Esta última regula la formación y la incorporación de las proteínas virales a los viroplasmatas. Actualmente no se ha caracterizado cómo se lleva a cabo la incorporación de las proteínas virales, ni los factores celulares que se encuentran en los viroplasmatas.

Se ha reportado que la inhibición del proteasoma bloquea la incorporación de VP1 a los viroplasmatas, por lo que es posible que bajo estas condiciones, VP1 interactúe o deje de interactuar con factores celulares o virales que la dirigen a dichas estructuras. La identificación de dichos factores nos permitirá caracterizar con mayor detalle la formación de los viroplasmatas y conocer las proteínas del hospedero involucradas en el proceso de replicación de los rotavirus.



## **Hipótesis**

Existen proteínas (celulares o virales) que interactúan con VP1, las cuales regulan la incorporación de esta proteína a los viroplasmos y estas interacciones son reguladas por el proteasoma.

## **Objetivo General**

Identificar factores celulares o virales que interactúen con la proteína estructural VP1.

## **Objetivos particulares**

1. Aislar factores celulares o virales que se unan a VP1.
2. Corroborar la interacción con VP1.
3. Analizar si el proteasoma regula estas interacciones.

## Materiales y Métodos

### Cultivo Celular y Virus

Se utilizaron células epiteliales de riñón de mono verde (MA104), las cuales fueron crecidas en medio D-MEM RS (High Clone) suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB), en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Para la realización de los experimentos las células fueron crecidas hasta llegar a confluencia. Se utilizó la cepa de rotavirus de mono Rhesus (RRV) la cual fue obtenida de una clona proporcionada por H. B. Greenberg (Universidad de Stanford, Stanford, CA).

### Generación de VP1 unido a una etiqueta de histidinas

Se obtuvo a VP1 a partir del plásmido pGEM3Z-VP1 utilizando los primers VP1-5' y YM3'. El primero tiene un sitio de corte para la enzima Sall, y el segundo para la enzima SmaI. Una vez obtenido el producto de PCR, fue purificado mediante el kit *High pure PCR product purification* (Roche) y se cuantificó en el Nanodrop. Posteriormente se digirió durante 2 horas 1 µg del producto de PCR purificado, utilizando las enzimas SmaI y Sall (New England, Biolabs). El producto de la digestión fue nuevamente purificado con el kit mencionado anteriormente, para ser utilizado en la reacción de ligación.

Como vector de clonación se utilizó el plásmido pET28b, el cual fue tratado de la siguiente manera. Primero se digirió con la enzima Not I (New England, Biolabs) por 2 horas a 37°C, después se realizó la reacción de "fill in", con la enzima Klenow (New England, Biolabs) durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA), posteriormente se digirió al plásmido con la enzima Sall durante

2 horas a 37°C. Finalmente se trató con la enzima CIP (New England, Biolabs) durante 30 minutos a 37°C. Después de cada paso la enzima era inactivada colocando la mezcla de reacción a 70°C durante 10 minutos.

El producto de la digestión se corrió durante 3 horas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%. Se cortó la banda que correspondía al peso molecular del plásmido (5.3 kb) y se purificó utilizando el kit *High pure PCR product purification* (Roche), finalmente se cuantificó con el Nanodrop.

Para realizar las ligaciones se colocó en la reacción tres veces el número de moles del inserto con respecto al del plásmido. En la ligación se utilizó la ligasa T4 (New England, Biolabs), la reacción se incubó 14 horas a 14°C. Posteriormente se purificó el producto de ligación mediante el método de fenol-cloroformo, resuspendiendo en un volumen final de 5 µl en agua.

El producto de la ligación se electroporó en células competentes JM101, XL-1 Blue y DH5α, y se plaqueó en medio LB sólido suplementado con Kanamicina (30µg/mL). Las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR. Las condiciones en las que se realizó esta reacción se describen en el anexo II. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% a 106 V durante 1 hora y se tiñó con bromuro de etidio. El gel se analizó en el equipo Thyphoon Trio (General Electrics).

La secuencia de los oligos, condiciones del PCR y el protocolo de clonación se encuentran detallados en los anexos I, II y III respectivamente.

## Obtención de lisado

Las células MA104 sembradas en cajas de 150 mm fueron infectadas con RRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, utilizando una caja por cada condición. Se dejó absorbiendo el virus durante una hora a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se realizaron 3 lavados con 5 mL medio MEM. Las células se incubaron con 8 mL de medio MEM adicionado con aminoácidos no esenciales (NEAA) (1X) y 3 µM de MG132 (en los casos en los que se menciona) durante 9 horas.

Pasado el tiempo, se eliminó el suero MEM mediante decantación. Las placas fueron colocadas sobre hielo y se lavaron 2 veces con 10 mL de PBS 1X frío. Las células se recuperaron raspando las cajas con un gendarme y se colectaron en un volumen final de 10 mL de PBS 1X, después se centrifugaron durante 10 minutos a 7,500 revoluciones por minuto (rpm) en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1620-A, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 3 mL de RIPA (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 150 mM, tritón 1%, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 1%, EDTA 10 mM, inhibidor de proteasas cOmplet 1X (Roche)). El inhibidor de proteasas cOmplete se utilizó de acuerdo a las indicaciones del productor.

Para eliminar los núcleos del lisado una vez que se centrifugó la pastilla celular, se le agregaron 3 mL de amortiguador NET (Tris-HCL pH7.5 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón 1%, cOmplet 1X). Se resuspendieron las muestras y se pasaron por una jeringa de 3 mL 10 veces, posteriormente se colocaron en hielo durante 10 minutos. Después la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 7,500

(rpm) en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1620-A. El sobrenadante fue pasado a un tubo Falcón de 15 mL y el precipitado se resuspendió en 500 µl de RIPA y se almacenó a -20°C. Al sobrenadante se le adicionaron 3 mL de RIPA (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 150 mM, tritón 1%, SDS 0.1%, desoxicicolato de sodio 1%, EDTA 10 mM, inhibidor de proteasas cOmplete 1X).

Finalmente después de incubar durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó por 10 minutos a 9,000 rpm en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1620-A, posteriormente se hicieron alícuotas de 500 µl y se almacenaron a -20 °C.

### Inmunoprecipitaciones

Se ajustó la proteína (240, 480 y 960 µg) a 500 µl de RIPA, a la cual se adicionó el suero policlonal αVP1, el cual fue producido en el laboratorio, en diferentes cantidades (5, 7.5, 10 y 12 µl) dejando que las interacciones ocurran durante 12 horas a 4°C en agitación. Pasadas las 12 horas, se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1689-L. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 500 µl. Se adicionaron 25 µl de proteína A-sefarosa (SIGMA) (o proteína A-sefarosa con suero policlonal αVP1 o el irrelevante, unido covalentemente) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente (TA) en agitación. Después se realizaron 3 lavados colocando 1 mL de amortiguador RIPA y centrifugando a 12,500 rpm durante 5 minutos en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1689-L, se eliminó el amortiguador RIPA y al precipitado se le adicionaron 50 µl de amortiguador Laemli 1X (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 1.7% SDS, 0.025% de azul de bromofenol, 10 % glicerol, 1.7% β-mercaptoetanol). Las muestras se

hirvieron durante 5 minutos y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser analizadas.

Unión covalente del anticuerpo  $\alpha\text{VP1}$  a la proteína A-sefarosa.

Se colocó a interaccionar durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $60\ \mu\text{l}$  del suero policlonal  $\alpha\text{VP1}$  con  $100\ \mu\text{l}$  de proteína A-sefarosa, ajustando a un volumen final de  $500\ \mu\text{l}$  en PBS 1X. Posteriormente se realizaron 5 lavados con  $1\ \text{ml}$  de PBS 1X, centrifugando durante 1 minuto a  $13,000\ \text{rpm}$  a TA en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1689-L, seguidos de 2 lavados con  $1\ \text{ml}$  de borato de sodio  $0.1\ \text{M}$ , pH 9, centrifugando durante 1 minuto a  $13,000\ \text{rpm}$  a TA. Se resuspendió la proteína A-sefarosa en  $1\ \text{mL}$  de buffer de boratos, el cual contenía  $20\ \text{mM}$  de dimethyl pimelimidate (DMP). Se colocó en agitación durante media hora a temperatura ambiente, pasado el tiempo se centrifugó durante 1 minutos a  $13,000\ \text{rpm}$  a TA, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en  $1\ \text{mL}$  de buffer de boratos que contenía  $20\ \text{mM}$  de DMP. Se dejó en agitación durante media hora a TA, pasado el tiempo nuevamente se centrifugó durante 1 minuto a  $13,000\ \text{rpm}$  a TA, se eliminó el sobrenadante y posteriormente se lavo la pastilla 2 veces, adicionando  $1\ \text{mL}$  de glicina  $50\ \text{mM}$  pH 2.5, después de cada lavado se centrifugó a  $13,000\ \text{rpm}$  durante 1 minuto a TA. Finalmente se lavó 5 veces con  $1\ \text{mL}$  de PBS 1X, después de cada lavado se centrifugó a  $13,000\ \text{rpm}$  durante 1 minuto a TA. La sefarosa fue resuspendida en  $100\ \mu\text{l}$  de PBS 1X y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Todas las centrifugaciones de este apartado se llevaron a cabo en una centrifuga Hettich utilizando el rotor 1689-L. Los anticuerpos policlonales  $\alpha\text{vimentina}$  y  $\alpha\text{NSP3}$  fueron utilizados como irrelevantes. Estos anticuerpos se unieron a la proteína A-sefarosa siguiendo el mismo protocolo que cuando se unió el  $\alpha\text{VP1}$ .

## Western Blot

Las muestras obtenidas en las inmunoprecipitaciones fueron separadas mediante electroforesis desnaturizante en geles SDS-PAGE al 10%, los cuales se corrieron a 150 V. Con el objetivo de cargar la misma cantidad de proteína y poder realizar comparaciones, el lisado de las inmunoprecipitaciones, así como el lisado total fueron diluidos 1:10, cargando un volumen final de 10  $\mu$ l.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, Mass), durante 1 hora a 130 mA utilizando el amortiguador de transferencia (CAPS 10 mM, pH 11 con 10% metanol). La membrana fue bloqueada con leche libre de grasa al 5% en PBS 1X- tween 0.2% durante 1 hora. Se eliminó el exceso de leche realizando dos lavados con PBS 1X-tween 0.2%. La membrana se incubó durante 1 hora a TA o durante toda la noche a 4°C con el suero  $\alpha$ VP1 (1:2000),  $\alpha$ NSP5 (1:500),  $\alpha$ NSP2 (1:2000) o  $\alpha$ TLPs (1:3000) según se indique, diluido en PBS 1X-tween 0.2%. Todos los anticuerpos fueron producidos en el laboratorio.

Después de incubar con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X-tween 0.2% y se incubó con proteína A acoplada a peroxidasa (GE Healthcare) (1:3000) durante 1 hora a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-tween 0.2%. Finalmente las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Lightning®-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin-Elmer, Massachusetts,



USA) siguiendo las instrucciones del proveedor, empleando la película hipersensible Kodak® X-Omat.

#### Tinción con nitrato de plata

La tinción con nitrato de plata se realizó como se describe a continuación. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis desnaturante en geles SDS-PAGE al 10%, los cuales se corrieron a 150 V. En este caso se cargaron 20 µl del lisado obtenido en las inmunoprecipitaciones. Posteriormente el gel se incubó durante 1 hora con la solución fijadora, y se lavó tres veces durante 20 minutos con 20 mL de etanol al 30%. Posteriormente se incubó por 1 minuto en la solución de pretratamiento y se realizaron 3 lavados de 20 segundos con agua.

Se incubó durante 20 minutos en la solución de plata. Después realizaron dos lavados de 20 segundos con agua.

Se adicionó la solución de revelado. Una vez que las bandas eran visibles se realizó un lavado de 2 minutos con agua. Finalmente se detuvo la reacción incubando por diez minutos con la solución de paro. El gel se guardó en 20 mL de metanol al 50% y se secó en el gel dryer (Bio-Rad). Las especificaciones del contenido de las soluciones se encuentran en el Anexo IV.

## Resultados

### Generación de la clona HIS-VP1

El uso de marcadores o etiquetas para poder purificar eficientemente proteínas es un método ampliamente utilizado. En este trabajo decidimos realizar una construcción para expresar a la proteína viral VP1 con una etiqueta de histidinas unida al extremo amino, esto con el objetivo de purificarla y posteriormente utilizarla en otros ensayos para identificar proteínas celulares que interaccionan con ella en diferentes condiciones. En el laboratorio se cuenta con una construcción que tiene la secuencia completa de VP1 (pGEMZ-VP1), por lo que decidimos amplificar a VP1 de esa construcción. Debido a que el vector en el que se encuentra es un vector de clonación, decidimos diseñar una serie de oligos para amplificarla mediante PCR y posteriormente clonarla en un vector de expresión. El oligo 5' tiene en su secuencia el triplete reconocido para el inicio de la traducción y un sitio de corte para la enzima Sall, mientras que el oligo 3' tiene un sitio de corte para la enzima SmaI. Los oligos fueron diseñados de tal manera que al ligar con el nuevo vector no se afectara la fase de lectura del mRNA correspondiente.

Con el fin de verificar la presencia de VP1 en el plásmido pGEM3Z-VP1, el plásmido fue analizado mediante ensayo de restricción con las enzimas BamHI y EcoRI, de las cuales hay sitios de corte en la secuencia de VP1 (Figura 4). Se encontró que los fragmentos de digestión correspondían a los esperados por lo que se continuó con el proceso de clonación utilizando como templado para el PCR a dicho plásmido.

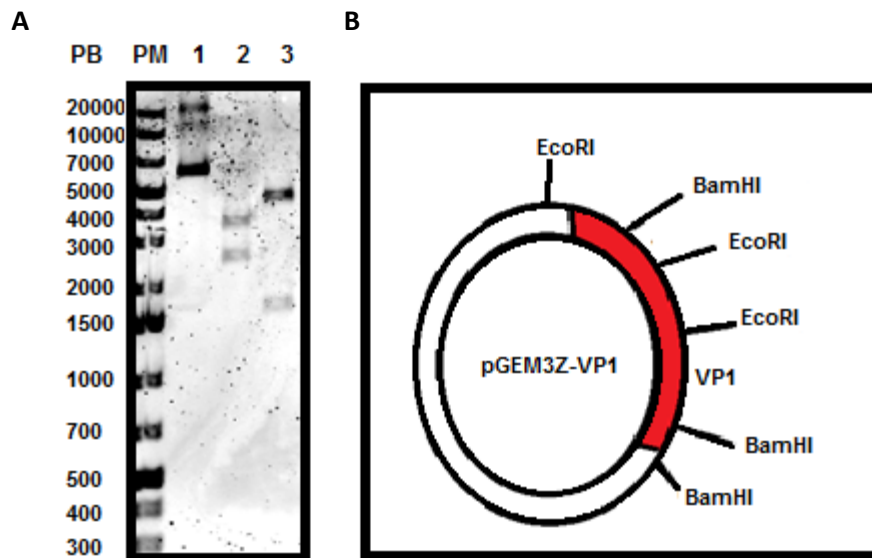


Figura 4. El plásmido pGEM3Z-VP1 contiene la secuencia que codifica para la proteína VP1. A) Plásmido pGEM3Z-VP1 digerido con las enzimas BamHI y EcoRI. 1: Plásmido sin digerir, 2: Plásmido digerido con BamHI, 3: Plásmido digerido con EcoRI, PM: Marcador de peso molecular. B) Representación esquemática de los sitio de corte de BamHI y EcoRI presentes en el plásmido pGEM3Z-VP1.

Para estandarizar la reacción de PCR, inicialmente se probó un gradiente de temperatura con un rango de 50°C a 60°C. Tomando como puntos 50°C, 52.7°C, 56.8°C y 60°C. En esta reacción se colocó como control una reacción en la que se utilizaron los oligos YM-3' y YM5'. Dichos oligos ya habían sido probados previamente y se sabía que funcionaban correctamente. Como se muestra en la figura 5, en todas las condiciones obtenemos un producto de 3.3 kb, el cual corresponde a VP1. La condición que elegimos para continuar realizando las reacciones fue a una temperatura de alineación de 56.8°C, aunque cualquier otra que estuviera en el rango de las que probamos tendría que funcionar.

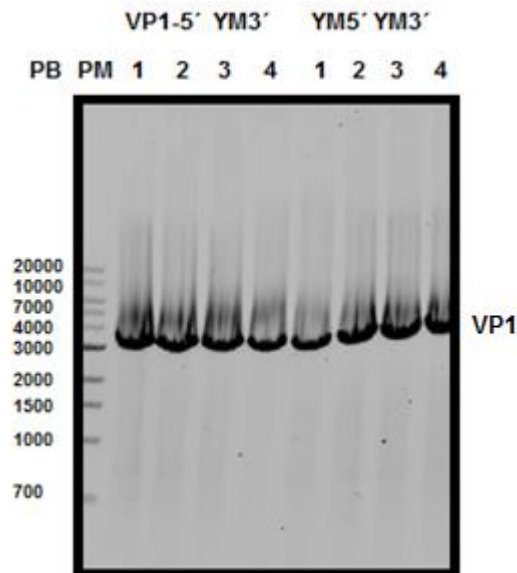


Figura 5. Estandarización de las condiciones de la reacción de PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo como se indica en el anexo II. Los oligos YM 5' y YM3' fueron utilizados como control positivo. La secuencia de los oligos se encuentra en el anexo I. Los números indican las siguientes temperaturas 1: 50°C, 2: 52.7°C, 3: 56.8°C y 4: 60°C. PB: Pares de bases, PM: Marcador de peso molecular. Se indica la presencia de VP1.

Una vez obtenido, el producto de PCR fue purificado para posteriormente ser tratado con las enzimas SmaI y Sall. Después de la reacción de digestión el producto de PCR fue nuevamente purificado y cuantificado para después ser utilizado en las reacciones de ligación como inserto.

Como vector de expresión utilizamos el plásmido pET28b, con este vector se puede adicionar una etiqueta de histidinas a la proteína de interés. Para esto el plásmido fue tratado como se describe en la sección de materiales y métodos. Posteriormente se purificó y se colocó en una reacción de ligación, con el inserto. El producto de la ligación fue purificado y electroporado en bacterias *E.coli* electrocompetentes, inicialmente se utilizaron bacterias JM101 aunque posteriormente también se realizó con cepas XL-1BLUE y DH5 $\alpha$ .

Las colonias obtenidas se probaron mediante PCR, utilizando los oligos 5' y YM3'. Aunque en la mayoría de los ensayos obtuvimos colonias, cuando se utilizaba *E.coli* JM101 ninguna de las colonias probadas tenía el inserto (Figura

6). Sin embargo cuando se utilizaban bacterias DH5 $\alpha$  o XL1-Blue al igual que JM101 se obtenían colonias, aunque en este caso al probarlas mediante PCR se observaba en algunas colonias una banda que correspondía al tamaño de VP1 3.3 kb (Figura 7A y 8A).

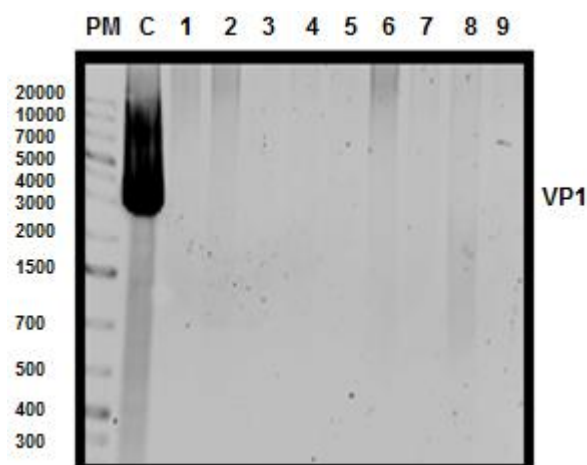


Figura 6. La clonación de VP1 no se logró realizar utilizando la cepa de *E. coli* JM101. PCR de las colonias obtenidas después de haber electroporado el producto de ligación entre el plásmido pET28b y el inserto (VP1), en células *E. coli* JM101, como se indica en materiales y métodos. Se probaron 9 colonias, las cuales se enumeran (1-9). C: Control positivo (pGEM3Z-VP1), PM: Marcador de peso molecular, PB: Pares de bases. Las condiciones utilizadas para realizar el PCR se mencionan en el anexo III. Se indica la presencia de una banda la cual corresponde a VP1.

Las colonias positivas al inserto por PCR fueron crecidas en medio LB líquido para después purificar el plásmido. Una vez que se tenía el plásmido purificado se realizó un análisis de restricción, en el cual se esperaba encontrar dos bandas, una correspondiente al inserto (3.3 kb) y al vector (5.4 kb). Sin embargo los patrones de restricción no correspondían a los esperados (Figura 8 B y 8 C). Además del ensayo de restricción, también se utilizó el plásmido para probarlo nuevamente por PCR utilizando el mismo set de oligos, pero al analizar el producto de PCR en todos los casos fueron negativos (Figura 7B).

Adicionalmente también se intentó realizar la clonación en los plásmidos pET28c y pFastBac HTA, aunque el resultado fue el mismo, por lo que no se pudo obtener dicha clona.

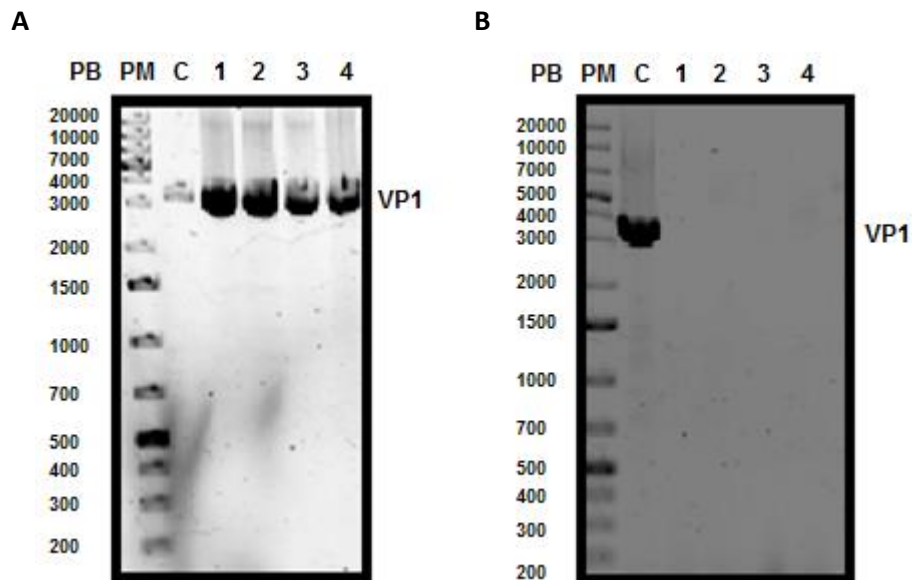


Figura 7. La clonación de VP1 en la cepa de *E.coli* XL1-BLUE generó falsos positivos. A) PCR de colonia de obtenidas después de haber electroporado el producto de ligación entre el plásmido pET28b y el inserto (VP1), en la cepa de *E. coli* XL1-BLUE. B) PCR utilizando el plásmido obtenido después de crecer las colonias positivas mostradas en A. Se probaron 4 colonias, las cuales se enumeran (1-4). C: Control positivo (pGEM3Z-VP1), PM: Marcador de peso molecular, PB: Pares de bases. Las condiciones utilizadas para realizar el PCR se mencionan en el anexo III. Se indica la presencia de una banda la cual corresponde a VP1.

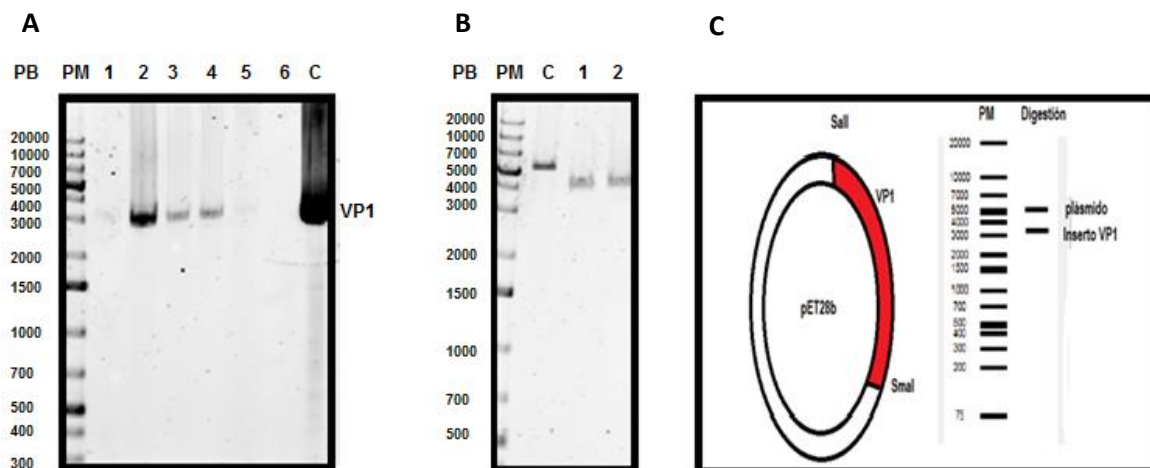


Figura 8. La clonación de VP1 en la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  generó falsos positivos. A) PCR de colonia de obtenidas después de haber electroporado el producto de ligación entre el plásmido pET28b y el inserto (VP1), en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . B) Digestión del plásmido aislado después de crecer las colonias marcadas con el número 2 y 3 de la A (marcadas en esta figura como 1 y 2 respectivamente). Después el plásmido se digirió con las enzimas SmaI y Sall. C) Representación esquemática de los sitios de corte de las enzimas Sall y SmaI, se muestra el patrón de bandeado esperado. Se probaron 6 colonias, las cuales se enumeran (1-6). C: Control positivo (pGEM3Z-VP1), PM: Marcador de peso molecular, PB: Pares de bases. Las condiciones utilizadas para realizar el PCR se mencionan en el anexo III. Se indica la presencia de una banda la cual corresponde a VP1.

## Inmunoprecipitaciones

Una manera de analizar interacciones proteína-proteína es realizando ensayos de inmunoprecipitación. Debido a que no pudimos obtener la clona de VP1 decidimos realizar inmunoprecipitaciones ya que contamos con un suero policlonal dirigido contra VP1. Para llevar a cabo estos experimentos se infectaron células MA104 con la cepa de rotavirus RRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, cosechando a las 9 hpi. Posteriormente las células se trataron como se describe en materiales y métodos. En estos ensayos utilizamos como control células sin infectar.

Inicialmente decidimos analizar si con este suero se podía llevar a cabo dicho ensayo, para esto se colocó a inmunoprecipitar el lisado equivalente a  $3.6 \times 10^6$  células con 5  $\mu$ l de suero policlonal  $\alpha$ VP1, en un volumen final de 500  $\mu$ l.

Se incluyeron controles en los cuales se incubaron los lisados solamente con el amortiguador RIPA sin adicionar el suero, los cuales posteriormente se trataron como se indica en materiales y métodos.

Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10%, el cual fue teñido con plata. Como podemos observar en la figura 9, cuando se inmunoprecipitó el lisado de células infectadas encontramos varias bandas, una de ellas por el peso molecular podemos decir que corresponde a VP1, mientras que la otra pueden ser VP6. Estas bandas no se encuentran en el lisado de células no infectadas. También podemos ver que las bandas más abundantes corresponden a las inmunoglobulinas.

Este resultado nos sugiere que el suero  $\alpha$ VP1 puede ser utilizado para inmunoprecipitar a VP1 y que puede ser usado para encontrar proteínas que se encuentren interaccionando con esta proteína en los lisados de células infectadas.

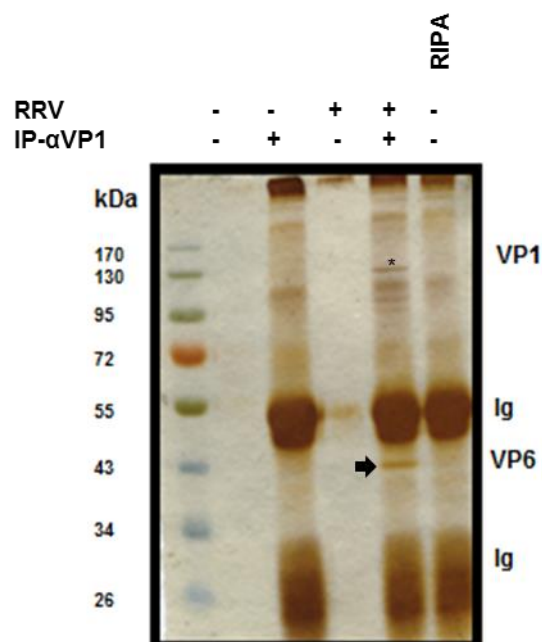


Figura 9. El suero policlonal  $\alpha$ VP1 puede ser utilizado para realizar los ensayos de inmunoprecipitación. Células MA104 fueron infectadas durante 9 horas con RRV e inmunoprecipitadas con el suero  $\alpha$ VP1 como se describe en materiales y métodos. Posteriormente las muestras se analizaron mediante tinción con nitrato de plata como se describe en el anexo IV, se cargaron volúmenes iguales de muestra (15  $\mu$ l). IP- $\alpha$ VP1: Lisados inmunoprecipitados con el suero  $\alpha$ VP1. Se indica VP1 con un asterisco, VP6 con una flecha y las inmunoglobulinas (Ig).



Con el objetivo de encontrar la cantidad de suero ( $\alpha$ VP1) necesario para inmunoprecipitar eficientemente a VP1, colocamos las muestras a interaccionar con diferentes cantidades del suero (7.5, 10 y 12 $\mu$ l) durante 12 horas. Posteriormente se adicionó 25  $\mu$ l de proteína A-sefarosa durante 1 hora a 4°C, se trataron las muestras como se describe en materiales y métodos, finalmente las muestras fueron analizadas mediante western blot (Figura 10).

En aquellas inmunoprecipitaciones en las que se colocó una cantidad de suero menor a 5  $\mu$ l (1.5 y 3  $\mu$ l) no logramos detectar a VP1 (Imagen no mostrada), mientras que con 7.5  $\mu$ l de suero  $\alpha$ VP1 observamos una eficiente inmunoprecipitación. En este experimento colocamos como control lisados, los cuales no se incubaron con el suero tanto en la condición control como de células infectadas. En estas condiciones pudimos ver que no se detectaba a VP1. En resumen, VP1 sólo puede ser detectada en la condición en la que las células están infectadas y se inmunoprecipita con el suero  $\alpha$ VP1.

De estas muestras realizamos tinción con plata. Pudimos observar dos bandas prominentes las cuales corresponden a las inmunoglobulinas, mientras que en el western blot se observó un barrido que podría corresponder de igual manera a las inmunoglobulinas o a proteínas que se unen inespecíficamente a la proteína A-sefarosa, ya que sólo se observa en condiciones en las que se inmunoprecipitó con el suero  $\alpha$ VP1. La presencia de estas proteínas las cuales por tinción en plata se ven poco abundantes pero que cuando se analiza mediante western blot son muy inmunoreactivas, podría afectar nuestra capacidad para detectar posibles proteínas que estén interaccionando con VP1. Sin embargo como estas proteínas no se detectan mediante tinción de

plata, puede ser que no interfieran en la detección mediante espectrometría de masas.

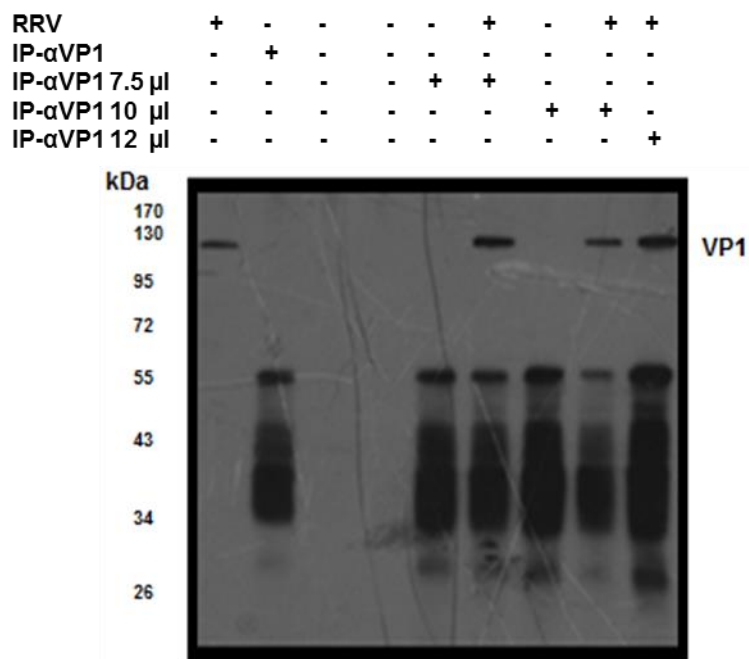


Figura 10. Determinación de la cantidad óptima del suero  $\alpha$ VP1 para realizar los ensayos de inmunoprecipitación. Células MA104 fueron infectadas durante 9 horas con RRV, se recuperó el lisado y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con diferentes cantidades del suero  $\alpha$ VP1 (7.5, 10 y 12  $\mu$ l), como se describe en materiales y métodos. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante western blot utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1 cargando volúmenes iguales de muestra (10  $\mu$ l). IP- $\alpha$ VP1: Lisados inmunoprecipitados con el suero  $\alpha$ VP1. Los carriles 1 y 3 muestran lisados totales de células infectadas y no infectadas respectivamente. Se indica la presencia de VP1.

### Unión covalente del suero $\alpha$ VP1 a la proteína A-sefarosa.

Con el objetivo de eliminar la presencia de las Ig's de las inmunoprecipitaciones, realizamos la unión covalente del suero  $\alpha$ VP1 y la proteína A-sefarosa, utilizando como agente entrecruzante DMP como se describe en materiales y métodos.

Una vez que teníamos el complejo proteína A-sefarosa- $\alpha$ VP1, lo colocamos a interaccionar con lisados de células infectadas y no infectadas durante 12 horas (Ver materiales y métodos), y analizamos los lisados mediante tinción de plata.

Como podemos observar en la Figura 11, la unión del anticuerpo covalentemente a la proteína A-sefarosa tiene como efecto la disminución en la

detección tanto de las cadenas ligeras como pesadas de inmunoglobulinas. Esto nos permitirá reconocer proteínas las cuales migran en el mismo peso molecular que estas proteínas.

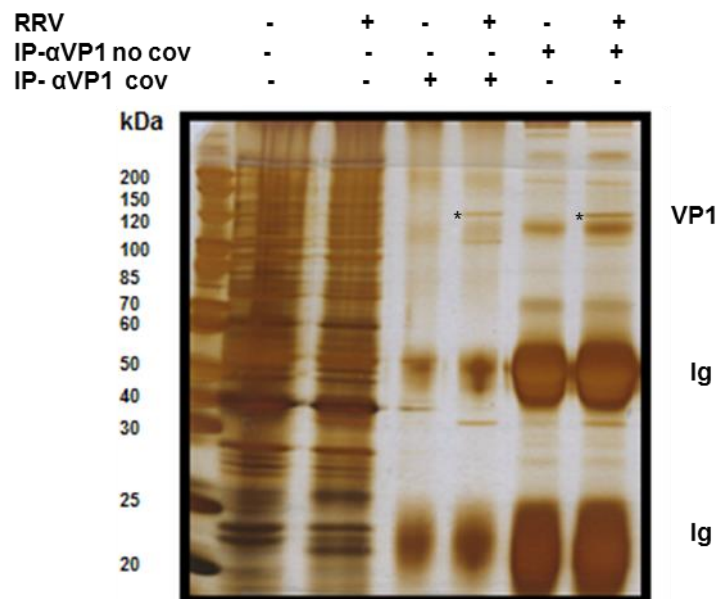


Figura 11. La unión covalente del suero  $\alpha$ VP1 a la proteína A-sefarosa reduce la detección de las inmunoglobulinas. Células MA104 fueron infectadas durante 9 horas con RRV, se recuperó el lisado y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con el suero  $\alpha$ VP1 unido o no de manera covalente a la proteína A-sefarosa. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante tinción con nitrato de plata cargando volúmenes iguales de muestra (15  $\mu$ l). IP- $\alpha$ VP1 no cov: Lisados inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 no unido covalentemente, IP- $\alpha$ VP1 cov: Lisados de inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 unido covalentemente. La unión de anticuerpo a la proteína A-sefarosa se realizó como se indica en materiales y métodos. Los carriles 2 y 3 muestran lisados totales de células infectadas y no infectadas respectivamente. VP1 se indica con un asterisco, también se indica las Igs.

### El suero $\alpha$ VP1 no inmunoprecipita DLPs y TLPs

Debido a que en las inmunoprecipitaciones podíamos observar la presencia de bandas las cuales por su peso molecular probablemente corresponden a alguna proteína viral estructural, decidimos analizar si el suero podía inmunoprecipitar DLPs o TLPs. Para esto incubamos en el amortiguador RIPA 5  $\mu$ l de TLPs y DLPs purificadas y las colocamos a interactuar con el suero  $\alpha$ VP1 durante 12 horas, posteriormente adicionamos proteína A-sefarosa, dejamos interactuar durante 1 hora, eluimos y analizamos las muestras mediante western blot utilizando como anticuerpo primario  $\alpha$ TLPs.

Como control corrimos en el gel DLPs y TLPs que no fueron inmunoprecipitados. Como podemos ver en la figura 12, no se inmunoprecipitaron DLPs ni TLPs, ya que no observamos la presencia de las proteínas estructurales en los carriles conteniendo los inmunoprecipitados con el suero, sin embargo podemos observar una banda la cual corresponde a la cadena pesada de la inmunoglobulina. Por lo que podemos concluir que nuestro suero no inmunoprecipita partículas virales.

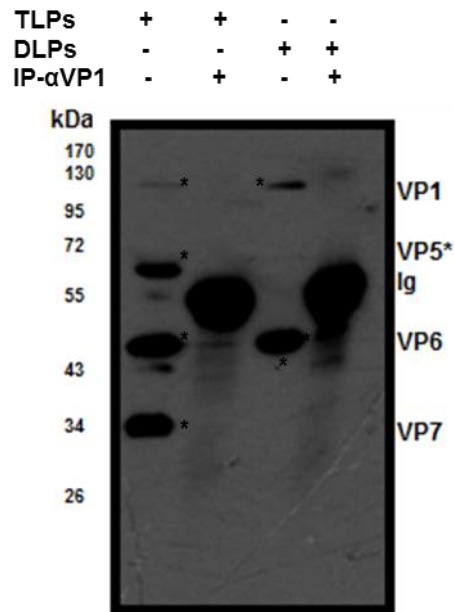


Figura 12. El suero  $\alpha$ VP1 no inmunoprecipita TLPs ni DLPs. TLPs y DLPs purificadas fueron inmunoprecipitadas utilizando el suero  $\alpha$ VP1 como se indica en materiales y métodos. Posteriormente el inmunoprecipitado fue analizado mediante western blot utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ TLPs. TLP: Partícula de tres capas, DLP: Partícula de dos capas, IP- $\alpha$ VP1: Lisados inmunoprecipitados realizados con el suero  $\alpha$ VP1. Se indica la presencia de las proteínas virales VP1, VP6, VP7, VP5\* con un asterisco y la cadena pesada de Inmunoglobulina (Ig).

### La inmunoprecipitación de VP1 es específica del suero utilizado.

Con el objetivo de analizar si la inmunoprecipitación del suero  $\alpha$ VP1 era específica, decidimos realizar las inmunoprecipitaciones utilizando un anticuerpo irrelevante, en este caso usamos el  $\alpha$ IgG de ratón. Para esto, lisados de células infectadas y no infectadas fueron incubadas con 30  $\mu$ l de  $\alpha$ IgG de ratón durante 12 horas, posteriormente se colocó a interaccionar con proteína A-sefariosa durante una hora, se lavaron los lisados y se eluyeron en

amortiguador de Laemli. Finalmente se analizaron las muestras mediante western blot utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1.

Como podemos observar en la figura 13 B, cuando se colocó a inmunoprecipitar el lisado de células infectadas con  $\alpha$ IgG no se observa la presencia de VP1. Adicionalmente realizamos inmunoprecipitaciones utilizando el suero policlonal dirigido contra la proteína NSP3,  $\alpha$ NSP3 (Figura 13 A). Este resultado nos indica que la inmunoprecipitación de VP1 es específica del suero que utilizamos. Ya que cuando utilizamos anticuerpos irrelevantes ( $\alpha$ IgG de ratón,  $\alpha$ NSP3) no se inmunoprecipita a VP1.

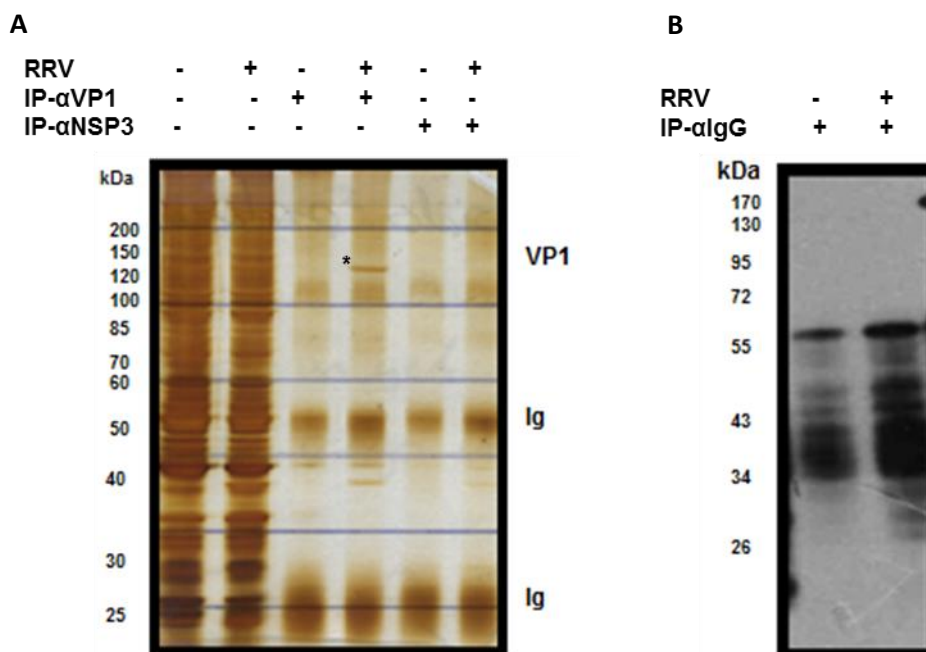


Figura 13. La inmunoprecipitación de VP1 es específica del suero utilizado. Células MA104 fueron infectadas durante 9 horas con RRV, posteriormente se recuperó el lisado y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con el suero  $\alpha$ VP1,  $\alpha$ NSP3 o  $\alpha$ IgG de ratón, unidos de manera covalente a la proteína A-sefarosa como se indica en materiales y métodos. Posteriormente los inmunoprecipitados fueron analizados por tinción con nitrato de plata (A), o western blot (B). A) Inmunoprecipitaciones utilizando el suero  $\alpha$ NSP3 como irrelevante, B) Inmunoprecipitaciones utilizando el anticuerpo  $\alpha$ IgG de ratón, se utilizó como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1. IP- $\alpha$ VP1: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 unido covalentemente a la proteína A-sefarosa, IP- $\alpha$ NSP3: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ NSP3, IP- $\alpha$ IgG: Inmunoprecipitaciones realizadas con el anticuerpo  $\alpha$ IgG de ratón. VP1 se indica con un asterisco.

## Clarificación de lisados celulares

Con el objetivo de eliminar proteínas que se pudieran estar uniendo inespecíficamente a la proteína A-sefarosa, decidimos pre-incubar los lisados solamente con la proteína A-sefarosa antes de que estos fueran utilizados para realizar las inmunoprecipitaciones. Utilizamos dos condiciones, la primera fue incubándola durante 12 horas, mientras que en la segunda se incubó durante 1 hora. Posteriormente analizamos los lisados mediante western blot, utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1, también se realizó tinción de plata.

En la figura 14 observamos que cuando incubamos durante 12 horas se unía VP1 a la proteína A-sefarosa, mientras que cuando se colocó solo una hora esta unión no se detectaba. Debido a esto decidimos clarificar durante 1 hora. Posteriormente el lisado fue utilizado para realizar los ensayos de inmunoprecipitación.

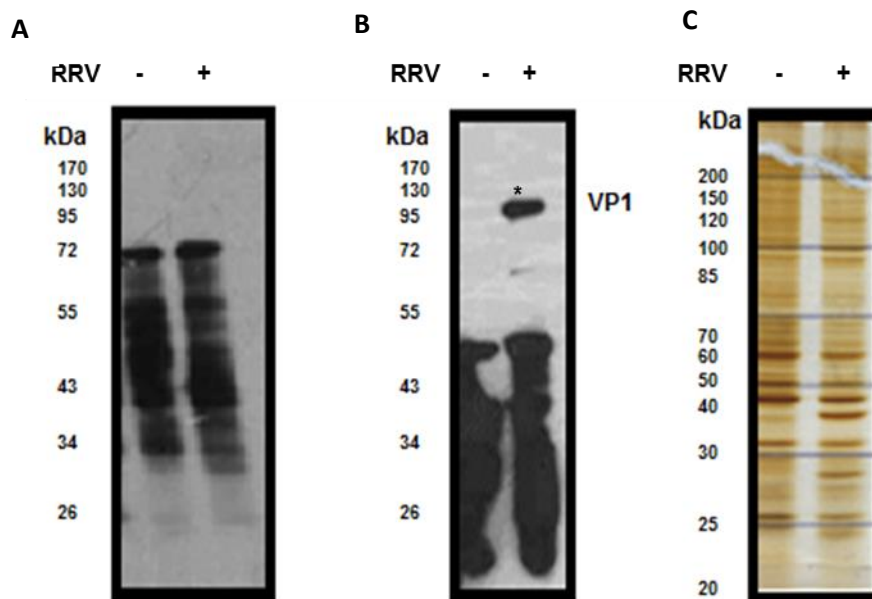


Figura 14. Estandarización del tiempo de clarificado de los lisados. Células MA104 fueron infectadas durante 9 horas con RRV, posteriormente se recuperó el lisado como se indica en materiales y métodos. El lisado que se utilizó para realizar los ensayos de inmunoprecipitación se colocó a interactuar con proteína A-sefarosa durante 1 hora (A) o 12 horas (B). Después, las proteínas unidas a la proteína A-sefarosa se eluyeron y se analizaron mediante western blot (A y B) utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1, y mediante tinción con nitrato de plata (C). VP1 se indica con un asterisco.

## Inmunoprecipitaciones realizadas con diferentes cantidades de lisado

Con el objetivo de encontrar la cantidad óptima de proteína con la que se pudiera realizar estos ensayos decidimos colocar diferentes cantidades de proteína (lisado) a inmunoprecipitar con  $\alpha$ VP1 unido covalentemente a proteína A-sefarosa. Las cantidades que colocamos fueron 240  $\mu$ g, 480  $\mu$ g y 960  $\mu$ g, igual que en los ensayos anteriores colocamos 25  $\mu$ l de proteína A-sefarosa la cual tiene unido covalentemente a  $\alpha$ VP1, dejamos interaccionar durante 1 hora a 4°C. Los lisados fueron tratados como se menciona en materiales y métodos, finalmente se analizaron mediante western blot. En la figura 15 podemos observar que colocando 960  $\mu$ g de lisado de células infectadas es suficiente para detectar la inmunoprecipitación de VP1. Debido a esto, los ensayos subsecuentes se realizaron colocando 960  $\mu$ g de proteína.

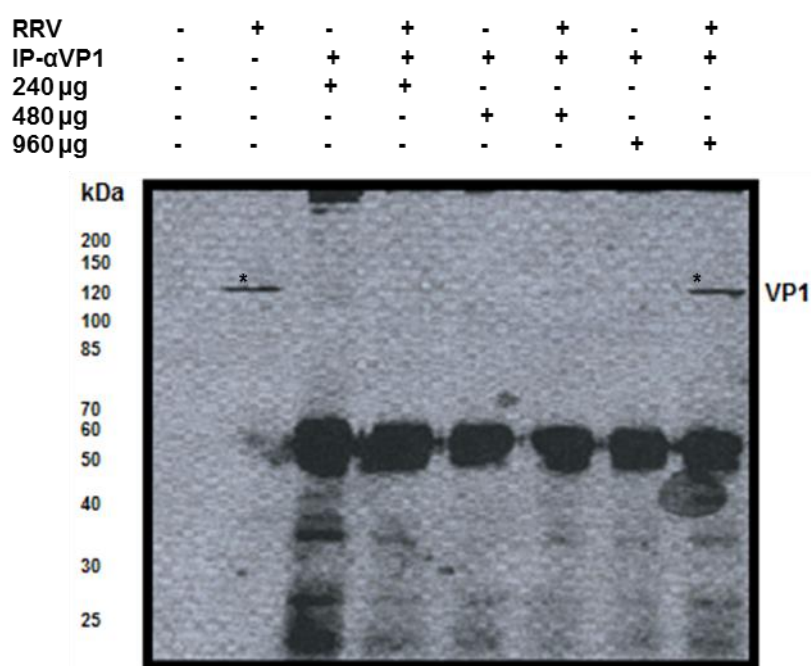


Figura 15. Estandarización de la cantidad óptima de lisado para realizar las inmunoprecipitaciones. Células MA104 fueron infectadas durante 9 horas con RRV, posteriormente se recuperó el lisado y se colocaron a inmunoprecipitar diferentes cantidades de lisado (240, 480 y 960  $\mu$ g) con el suero  $\alpha$ VP1 unido de manera covalente a la proteína A-sefarosa, como se indica en materiales y métodos. Después las proteínas eluidas fueron analizadas mediante western blot, utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1. El carril 1 y 2 muestra los lisados totales de células no infectadas e infectadas respectivamente. IP- $\alpha$ VP1: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. Se indica la presencia de VP1 con un asterisco.

## **Inmunoprecipitaciones de lisados de células infectadas y tratadas con MG132.**

Posteriormente se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación eliminando núcleos para solo quedarnos con las proteínas citosólicas y también para eliminar el DNA el cual dificultaba la manipulación de las muestras. Además debido a que bajo las condiciones anteriores no se lograba ver una diferencia en las proteínas que se inmunoprecipitan al comparar las condiciones control e infectadas, decidimos ver si en la condición en la que se inhibe el proteasoma podíamos observar alguna diferencia. Para esto células MA104 fueron infectadas con RRV a una MOI de 3, se tuvieron tres condiciones, células sin infectar (Control), células infectadas y células infectadas tratadas con 3  $\mu$ M de MG132. Se cosechó a las 9 hpi y se trataron las muestras como se indica en materiales y métodos. Inicialmente analizamos mediante western blot la cantidad de VP1 presente en las células infectadas y las células infectadas tratadas con MG132. Como se puede observar en ambas condiciones se obtuvieron cantidades similares de dicha proteína (Figura 16).

Con este lisado se procedió a realizar los ensayos de inmunoprecipitación colocando 25  $\mu$ l de proteína A-sefarosa la cual tenía unido covalentemente  $\alpha$ VP1, utilizamos como anticuerpo irrelevante  $\alpha$ -vimentina. Las muestras fueron analizadas mediante western blot (Figura 17 A). Como podemos observar, aunque este inhibido el proteasoma se sigue inmunoprecipitando a VP1, aunque en una menor cantidad, pero también se observa una menor cantidad en el lisado total. También se puede observar en la tinción de plata que básicamente se inmunoprecipitan las mismas proteínas que en la condición en la que no se coloca MG13 (Figura 17 B).



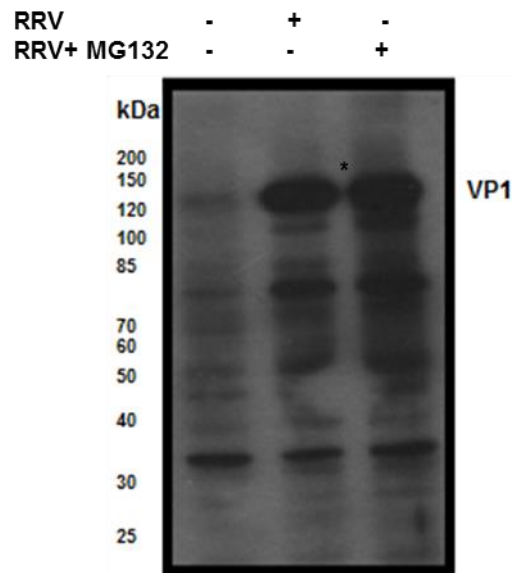


Figura 16. La inhibición del proteasoma no afecta la síntesis de VP1. Células MA104 fueron infectadas con RRV y tratadas o no con 3 $\mu$ M de MG132, incubando durante 9 horas, posteriormente se recuperó el lisado y se analizó la presencia de VP1 mediante western blot, utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1. VP1 se indica con un asterisco.

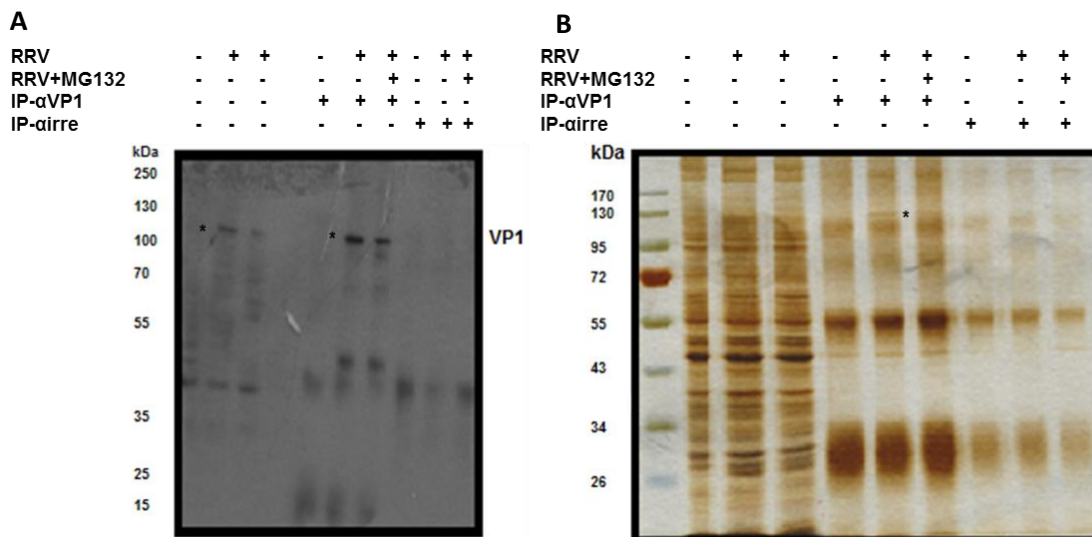


Figura 17. La inhibición del proteasoma no afecta la inmunoprecipitación de VP1. Células MA104 fueron infectadas con RRV, y tratadas o no con 3 $\mu$ M de MG132, se dejó incubando durante 9 horas. Posteriormente se recuperó el lisado y se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación utilizando el suero  $\alpha$ VP1 o un suero irrelevante como se describe en materiales y métodos. Las proteínas eluidas fueron analizadas mediante western blot (A), utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ VP1, o tinción de plata (B). Los primeros tres carriles muestran los lisados completos. IP- $\alpha$ VP1: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. IP- $\alpha$ irre: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ vimentina unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. VP1 se señala con un asterisco. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Se ha reportado previamente que VP1 puede interactuar con NSP2 y NSP5, por lo que analizamos mediante western blot la interacción con estas proteínas. Para esto los lisados fueron tratados como se menciona anteriormente y fueron analizados mediante western blot utilizando los anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas. Como podemos observar en la figura 18 se inmunoprecipita la misma cantidad de NSP5 en las células infectadas y en las células infectadas y tratadas con MG132. Sin embargo cuando analizamos a NSP2 observamos que hay una disminución en la condición tratada con MG132 (Figura 19). Estos datos nos permiten sugerir que la interacción entre VP1 y NSP5 no se afecta bajo la condición en la que se inhibe el proteasoma, pero la interacción entre NSP2 y VP1 si se afecta.

RRV	-	+	+	-	+	+	-	+	+
RRV+MG132	-	-	-	-	-	+	-	-	+
IP- $\alpha$ VP1	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IP- $\alpha$ irre	-	-	-	-	-	-	+	+	+

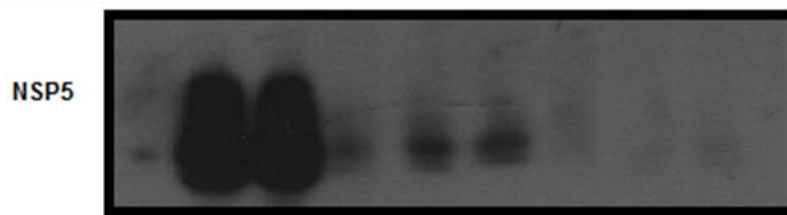


Figura 18. La interacción entre NSP5 y VP1 no se afecta cuando se inhibe el proteasoma. Células MA104 fueron infectadas con RRV, y tratadas o no con 3 $\mu$ M de MG132, se dejó incubando durante 9 horas. Posteriormente se recuperó el lisado y se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación utilizando el suero  $\alpha$ VP1 o un anticuerpo irrelevante como se describe en materiales y métodos. Las proteínas eluidas fueron analizadas mediante western blot utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ NSP5. Los primeros tres carriles muestran los lisados completos. IP- $\alpha$ VP1: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. IP- $\alpha$ irre: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ imentina unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

RRV	-	+	+	-	+	+	-	+	+
RRV+MG132	-	-	-	-	-	+	-	-	+
IP- $\alpha$ VP1	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IP- $\alpha$ irre	-	-	-	-	-	-	+	+	+

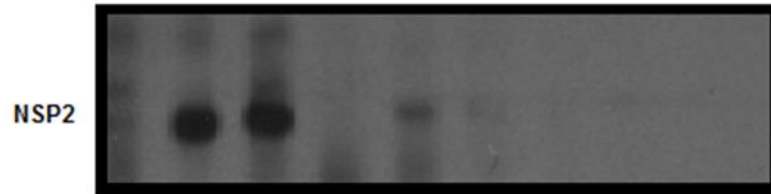


Figura 19. La interacción entre NSP2 y VP1 se afecta cuando se inhibe el proteasoma. Células MA104 fueron infectadas con RRV, y tratadas o no con 3  $\mu$ M de MG132, se dejó incubando durante 9 horas. Posteriormente se recuperó el lisado y se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación utilizando el suero  $\alpha$ VP1 o un suero irrelevante, como se describe en materiales y métodos. Las proteínas eluidas fueron analizadas mediante western blot, utilizando como anticuerpo primario el suero  $\alpha$ NSP2. Los primeros tres carriles muestran los lisados completos. IP- $\alpha$ VP1: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ VP1 unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. IP- $\alpha$ irre: Inmunoprecipitaciones realizadas con el suero  $\alpha$ vimentina unido covalentemente a la proteína A-sefarosa. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

## Discusión

El genoma de rotavirus está formado por once segmentos de dsRNA, los cuales codifican para proteínas estructurales y no estructurales. Para que el genoma pueda replicarse es necesaria la presencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA, en el caso de los rotavirus esta función la lleva a cabo la proteína estructural VP1<sup>1</sup>. Esta proteína tiene la capacidad de generar tanto mRNAs, los cuales sirven como templates para la síntesis de proteínas virales, como dsRNA que sirve como genoma para los nuevos viriones respectivamente<sup>57</sup>.

Los virus poseen una información genética limitada, esto los hace depender de la maquinaria celular para poder llevar a cabo eficientemente su ciclo de replicación, muchas veces utilizan los factores celulares presentes en la célula y otras tantas modifican los factores existentes. Para que se lleve a cabo la replicación y transcripción del RNA viral no solo se requiere de la presencia de las RNA polimerasas dependientes de RNA, en diferentes virus que tienen genoma de RNA se ha reportado que hay proteínas asociadas tanto a las RNA polimerasas como al RNA<sup>62</sup>. Sin embargo en el caso de rotavirus, aún no se ha reportado que la proteína VP1 interactúe con proteínas celulares.

López y colaboradores<sup>60</sup> observaron que tras la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma, utilizando el inhibidor MG132, había una disminución en la producción de progenie viral, también reportaron que bajo estas condiciones la cantidad de proteína viral no cambia. Sin embargo observaron que había una disminución en el tamaño y un incremento en el número de los viroplasmos, los cuales funcionan como centros replicativos del virus. Adicionalmente se observó que había una pérdida de la localización de la polimerasa viral VP1, la cual pasó de tener un patrón de localización en viroplasmos a encontrarse distribuida en el citoplasma (Figura 3).

La pérdida de localización de VP1 podría ser debido a las siguientes razones: 1.- VP1 está interactuando con alguna(s) proteína(s) celular(es), y esta interacción le permite localizarse en los viroplasmos y bajo la condición en la que se inhibe el proteasoma esta interacción(es) se pierde. 2.- la inhibición del proteasoma provoca la asociación de VP1 con alguna(s) proteína(s) celular(es)

y esta(s) interacción(es) no le permiten asociarse a los viroplasmata. 3.- La inhibición del proteasoma modifica la interacción de VP1 con alguna proteína viral.

Para poder analizar las diferentes posibilidades decidimos realizar una construcción que expresara a VP1 unida a una etiqueta de histidinas en el amino terminal, ya que previamente se había reportado que la presencia de esta etiqueta no afecta la localización de VP1 ni la incorporación a los viriones<sup>63</sup>. Una vez obtenida la construcción sería expresada y utilizada para realizar ensayos de cromatografía de afinidad, con el fin de estudiar las interacciones in-vitro de VP1 con proteínas celulares.

Sin embargo no pudimos obtener dicha construcción. Para realizar la clonación de VP1 utilizamos diferentes cepas de *E.coli*, inicialmente JM101, la cual se utiliza habitualmente en el laboratorio. También utilizamos DH5 $\alpha$  (electro y quimio competentes) y XL1-Blue debido a que son cepas defectivas en el sistema de recombinación RecA. De los resultados obtenidos con estas cepas creemos que probablemente en el momento en el que ponemos a crecer las colonias que salieron positivas por PCR, el vector está liberando del inserto por algún mecanismo o que al purificar la ligación se estén quedando restos del inserto, los cuales no se integraron al vector pero sí se electroporaron en las bacterias, y puede ser que estos restos sean detectados por el PCR dando los falsos positivos.

Además del vector pET28 (b,c) también intentamos clonar a VP1 utilizando el vector pFastBacHT. También se decidió intentar clonar a VP1 a partir de RNA viral sin embargo el resultado fue el mismo. Para realizar la clona utilizamos una estrategia similar a una reportada<sup>63</sup> sin embargo no hemos podido obtener dicha clona, por lo que seguiremos intentando clonar a VP1. Una posible estrategia es utilizar el sistema de vectores TOPO, ya que probablemente los extremos del producto de PCR no se estén cortando, por lo que para asegurar que el corte se realice podríamos clonar utilizando el sistema de vectores TOPO, una vez clonado en TOPO podríamos tratarlo con enzimas de restricción lo que nos aseguraría que el corte se está realizando para

posteriormente clonarlo en un vector de expresión que nos permita unir la etiqueta de histidinas.

Otra forma en la que se pueden analizar las interacciones proteína-proteína es mediante ensayos de inmunoprecipitación, en los cuales se hace uso de un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. Debido a que en el laboratorio contamos con un suero policlonal  $\alpha$ VP1 decidimos estandarizar ensayos de inmunoprecipitación. Determinamos que la cantidad óptima de suero era de 7.5  $\mu$ l ya que con esta cantidad podíamos inmunoprecipitar eficientemente a VP1 (Figura 10). También determinamos la cantidad óptima de lisado celular para inmunoprecipitar a VP1 (960 $\mu$ g). La interacción de nuestro anticuerpo era específica ya que cuando lo colocábamos a interactuar con un lisado de células no infectadas no detectábamos alguna proteína la cual estuviera en el mismo peso molecular de VP1 (125 kDa).

Además la especificidad del suero para inmunoprecipitar a VP1 se demostró ya que cuando se utilizó un anticuerpo irrelevante ( $\alpha$ IgG de ratón,  $\alpha$ NSP3 o  $\alpha$ vimentina) no se inmunoprecipitaba a VP1, este control también nos permitió analizar proteínas que se unen inespecíficamente ya que las podemos ver cuando se inmunoprecipita con el  $\alpha$ VP1 o con el irrelevante.

Debido a que puede haber interacciones inespecíficas entre la resina (proteína A-sefarosa) y las proteínas celulares presentes en el lisado, decidimos realizar un paso de clarificado en el cual colocábamos a interactuar la resina con el lisado y éste posteriormente se utilizaba para realizar las inmunoprecipitaciones. Determinamos que el tiempo óptimo de clarificación era de 1 hora.

En los clarificados de los lisados observamos una gran cantidad de proteínas que se unían inespecíficamente a la proteína A-sefarosa, sin embargo al comparar las diferentes imágenes observamos que cuando colocábamos a la proteína A-sefarosa que tenía unido covalentemente a VP1 este pegado inespecífico no se observaba, es decir hay un pegado diferente de proteínas a la proteína A-sefarosa cuando tiene unido un anticuerpo a cuando no lo tiene unido. Por lo que consideramos que podemos eliminar el proceso de clarificado de lisado.

Al realizar la tinción con nitrato de plata observamos la presencia de bandas las cuales por el peso molecular que presentan pueden ser las proteínas virales estructurales VP2 y VP6. Si bien el patrón de bandeo entre la condición de células infectadas y células no infectadas era diferente, por la presencia de proteínas virales, no descartamos que hubiera otras proteínas en baja abundancia, lo cual dificultaba su visualización ya que estas proteínas pueden estar en una concentración inferior al límite de detección de la tinción de plata. La interacción entre la proteína viral en partículas fue descartada ya que el suero  $\alpha$ VP1 no inmunoprecipitó DLPs o TLPs. En las tinciones de plata tenemos una gran cantidad de Inmunoglobulinas, lo cual nos impide analizar con detalle si se están bajando otras proteínas las cuales migren en el mismo peso molecular. Sin embargo mediante la unión covalentemente el suero  $\alpha$ VP1 a la proteína A-sefarosa, la cantidad de inmunoglobulinas detectadas disminuyó y en estas condiciones seguimos inmunoprecipitando a VP1, por lo que decidimos utilizar esta metodología para analizar las interacciones entre VP1 y proteínas celulares.

Bajo las condiciones de inmunoprecipitación establecidas no pudimos observar diferencias en las proteínas celulares que inmunoprecipitan con VP1 comparando la condición de células infectadas y no infectadas, por lo que decidimos no analizarlas mediante espectrometría.

La presencia de núcleos en los lisados a inmunoprecipitar dificultaba la manipulación del lisado, además debido a que el ciclo replicativo de rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma es muy poco probable que VP1 interaccione con proteínas nucleares, por lo que decidimos eliminar los núcleos solubilizando con tritón y posteriormente separándolos del lisado mediante centrifugación diferencial. El tratamiento con tritón no afectó los ensayos de inmunoprecipitación ya que se seguía inmunoprecipitando a VP1.

En la condición en la cual se inhibe el proteasoma se observa que la proteína estructural VP1 no se localiza en los viroplasmos y presenta un patrón de tinción difuso en el citoplasma (Figura 3). Debido a que la pérdida de localización de la proteína viral se da en condiciones en las cuales se inhibe el proteasoma decidimos realizar los ensayos de inmunoprecipitación bajo dicha

condición, por lo que tratamos a las células infectadas con 3 $\mu$ M de MG132 el cual es un fármaco inhibidor del proteasoma. López y colaboradores<sup>60</sup> mostraron que en esta condición la viabilidad celular no se afecta.

Al realizar los ensayos de inmunoprecipitación observamos que no podíamos detectar mediante tinción de plata alguna interacción diferente a la condición en que no se trataba con el inhibidor. Debido a esto, decidimos que no era viable analizar estas muestras mediante espectrometría ya que además muchas de las proteínas que se inmunoprecipitan también las observamos cuando inmunoprecipitamos con el anticuerpo irrelevante.

La proteína VP1 interacciona en los viroplasmos con la proteína estructural VP2, VP3 y con las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5<sup>35</sup>. Cuando NSP2 y NSP5 son transfectadas en células, pueden formar VLS<sup>48</sup>, lo que ha permitido el estudio in vitro de la dinámica de formación de estas estructuras. La proteína estructural NSP5 es la encargada de reclutar a las proteínas que se localizan en viroplasmos<sup>16</sup> incluida VP1, si bien VP1 puede interactuar con NSP5 y NSP2 la interacción entre NSP5 y VP1 es mayor que con NSP2<sup>50</sup>. Debido a la importancia que tienen estas proteínas en la formación de los viroplasmos decidimos analizar en los inmunoprecipitados la interacción entre NSP5 y NSP2 con VP1.

La interacción entre NSP5 y VP1 no se ve afectada cuando se inhibe el proteasoma sin embargo al parecer la interacción con NSP2 sí, ya que se inmunoprecipita una menor cantidad de esta proteína. Esto sugiere que la inhibición del proteasoma afecta la interacción entre NSP2 y VP1 y que esta interacción es importante para que VP1 sea localizada en los viroplasmos. Si bien la interacción entre VP1 y NSP5 es más fuerte, estos ensayos fueron realizados in vitro, es decir expresando solamente a VP1 y NSP5 o NSP2, por lo que en un modelo de infección pudiera ser que la interacción entre NSP2 y VP1 sea de mayor importancia.

La inhibición del proteasoma con MG132 tiende a provocar la generación de agresomas<sup>64</sup> por lo que probablemente una de las proteínas NSP2 o VP1 se dirige a estos cuerpos lo que impide que interactúen, sin embargo hace falta realizar ensayos para confirmarlo. Para poder confirmar esta hipótesis se



podrían realizar ensayos de colocalización utilizando un anticuerpo contra alguna proteína marcadora de agresomas y contra VP1 o NSP2.

Otra posibilidad es que se induzcan cambios conformacionales en una o ambas proteínas lo que de igual manera impide su interacción. La proteína NSP2 forma octámeros<sup>28</sup>, probablemente la inhibición del proteasoma afecte el ensamblaje de estos octámeros y esto le impida interactuar con VP1, o que de alguna manera esta inhibición provoque un cambio en el plegamiento de VP1.

Durante el transcurso de la infección los viroplasmos incrementan en tamaño y disminuyen en número, sin embargo cuando se inhibe el proteasoma los viroplasmos disminuyen en tamaño pero incrementan en número, este fenotipo se podría explicar debido a que VP1 no interactúa con NSP2 y probablemente esta interacción sea importante para que los viroplasmos se fusionen. Otra posibilidad es la pérdida adicional de la interacción con otra(s) proteína(s) celular(es) que sean importantes para que esta fusión se lleve a cabo.

Si bien bajo nuestras condiciones experimentales no detectamos la presencia de interacciones entre VP1 y factores celulares no descartamos que estas interacciones se lleven a cabo. Probablemente las interacciones se lleven a cabo con proteínas que son poco abundantes lo que dificulta su detección, por lo que podríamos enriquecer las muestras con el fin de incrementar la cantidad de proteína y poder detectar dichas proteínas. Nuestros datos indican que la interacción entre las proteínas virales VP1 y NSP2 se ve afectada, esto puede ser la causa por la cual VP1 no se localiza en los viroplasmos en la condición en la cual el proteasoma está inhibido.

## **Conclusiones**

Se realizó la estandarización de los ensayos de inmunoprecipitación.

En nuestros ensayos podemos detectar a VP1 pero no observamos cambios evidentes en las proteínas que inmunoprecipitan.

Los datos sugieren que hay una pérdida de interacción entre VP1 y NSP2.

## Anexo I

Secuencias de oligos.

VP1-5´. AGTC**GT****CGAC**ATGGGGAAGTATAATC.

YM-3´. CAGAC**CCCGGG**CCGCGGTCACATCTAAGCG.

YM-5´. CAGAC**CCCGGG**TACCTATTAAAGCTATACA.

En rojo se muestra el sitio de corte para la enzima Sall (VP1-5´) y SmaI (YM-3´). En azul se muestra el codón de inicio de la traducción en el oligo VP1-5´.

## Anexo II

Condiciones para realizar PCR.

Plásmido pGEM3Z-VP1: 50 ng

Oligo YM-3´: 1µl a una concentración de 50 pMol/µl

Oligo VP1-5´: 1µl a una concentración de 50 pMol/µl

Klentaq Buffer 1X: 5µl

dNTPs 5mM: 2µl

Klentaq pol: 1µl

H<sub>2</sub>O cbp 50µl

Programa utilizado en el termociclador.

1. 3 min a 94°C
2. 30 s a 94°C
3. 30 s a 56°C
4. 3.5 min a 72°C
5. 5 min a 72°C

30 ciclos de los pasos 2-4.

## Anexo III

Protocolo para clonación de VP1 en pET28.

### Digestión del producto de PCR

Producto de PCR: 2µg

Sall: 2µl

NEB 4 10X: 2µl

H<sub>2</sub>O cbp 20µl

Incubar durante 2 horas a 25°C

Inactivar la enzima colocando la reacción durante 10 minutos a 70°C.

Reacción anterior: 20 µl

SmaI: 2µl

NEB3 10X: 4µl

BSA 1X: 4µl

H<sub>2</sub>O cbp 40µl

Incubar durante 2 horas a 37°C

Inactivar la enzima colocando la reacción durante 10 minutos a 70°C.

Purificar con el Kit *High pure PCR product purification* (Roche)

### Digestión del plásmido pET28 (b)

Plásmido pET28(b): 2µg

Not I: 2µl

NEB 3 10X: 4µl

BSA 1X: 4µ

H<sub>2</sub>O cbp 40μl

Incubar por 2 horas a 37°C

Inactivar la enzima colocando la reacción durante 10 minutos a 70°C.

Reacción de “rellenado” fillin in.

Reacción anterior: 40μl

dNTPs 1mM: 2μl

Klenow pol: 1 μl (1U/μg)

Incubar por 15 min a temperatura ambiente.

Inactivar la enzima colocando la reacción durante 10 minutos a 70°C.

Reacción anterior: 42μl

Sall: 2μl

NEB 3 10X: 6μl

BSA 1X: 6μl

H<sub>2</sub>O cbp 60μl

Incubar por 2 horas a 37°C.

Inactivar la enzima colocando la reacción durante 10 minutos a 70°C.

Reacción con fosfatasa alcalina intestinal de cabra (CIP).

Reacción anterior: 60μl

CIP: 1μl

NEB 3 10X: 7μl

H<sub>2</sub>O cbp 70μl

Incubar durante 30 minutos a 37°C.

Inactivar la enzima durante 10 minutos a 70°C.

El plásmido fue purificado utilizando el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo SCIENTIFIC).

Reacción de ligación.

Producto de PCR: 3fmol

pET28b: 1fmol

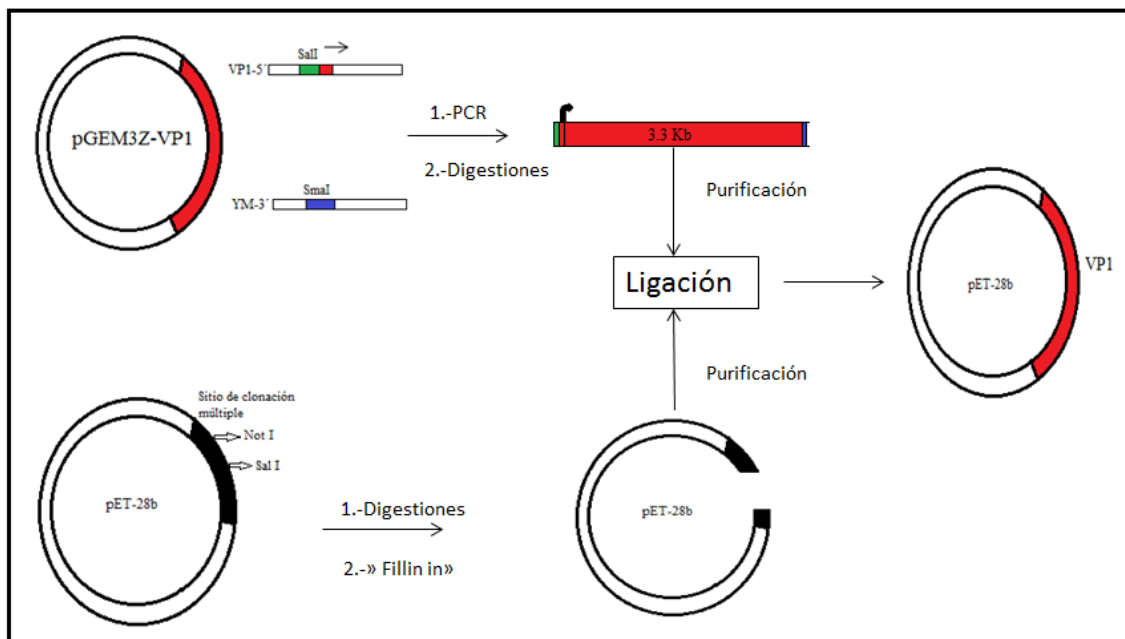
Buffer ligasa T4 10X: 1µl

T4 DNA ligasa: 1µl

H<sub>2</sub>O cbp 10µl

Incubar 12 horas a 14 °C.

Representación esquemática de la metodología utilizada para la generación de la clona.



## Anexo IV

Solución fijadora

Metanol al 50%, 15 ml

Ácido acético al 37%, 3.6 ml

Formaldehido 15 µl

Agua, 11.4 ml

Solución de pretratamiento.

Tiosulfato de sodio (0.01g/50ml H<sub>2</sub>O)

Solución de plata.

Nitrato de plata 1X (0.18g/ml),

Formaldehido, 22.5µl.

Agua, 30 ml.

Solución de revelado.

Carbonato de sodio, 16gr.

Formaldehido, 15µl.

Tiosulfato de sodio (0.01gr/50ml H<sub>2</sub>O), 600µl.

Agua, 30ml.

Solución de paro.

Metanol al 50%, 15 ml

Ácido acético al 37%, 3.6 ml

Agua, 11.4 ml

## Referencias

1. Estes MK, Kapikian, Z A. Rotavirus. Knipe M D, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:1917–1974.
2. Joseph PB, Estes MK. Structural organization of the genome in rotavirus. Gray J, Desselberger U, eds. *Viral Gastroenteritis*. Elsevier Science B.V; 2003:115–127.
3. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J. Infect. Dis.* 2010;202 Suppl:43–48.
4. Jim G, Timo V, Pierre Van D. Rotavirus. *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008;46:24–31.
5. López S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 2004;12(6):271–278.
6. Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol* . 2004;78(19):10213–10220.
7. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF, Conner ME. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event?. *Lancet.* 2003;362(9394):1445–1449.
8. Lorrot M, Vasseur M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea ? 2007;6:1–6.
9. Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008;153(8):1621–1629.
10. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005;15(1):29–56.
11. Rey.F.A, Lepault JC. The three-dimensional structure of rotavirus VP6. In: U D JG, ed. *Viral Gastroenteritis*. Elsevier Science B.V; 2003:129–141.
12. Díaz-Salinas MA, Romero P, Espinosa R, Hoshino Y, López S, Arias CF. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *J. Virol.* 2013;87(3):1658–1663.
13. Poruchynsky MS, Maass DR, Atkinson PH. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J. Cell Biol.* 1991;114(4):651–656.
14. Taraporewala ZF, Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res.* 2004;101(1):57–66.



15. Patton JT, Jones MT, Kalbach AN, He YW, Xiaobo J. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 1997;71(12):9618–9626.
16. Contin R, Arnoldi F, Campagna M, Burrone OR. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J. Gen. Virol.* 2010;91(Pt 7):1782–1793.
17. Chen D, Luongo CL, Nibert ML, Patton JT. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology.* 1999;265(1):120–130.
18. Zhang R, Jha BK, Ogden KM, Dong B, Zhao L, Elliott R, Patton JT, Silverman RH, Weiss SR. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110(32):13114–13119.
19. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(3):165–177.
20. Taniguchi K, Kojima K, Kobayashi N, Urasawa T, Urasawa S. Structure and function of rotavirus NSP1. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:53–58.
21. Bagchi P, Dutta D, Chattopadhyay S, Mukherjee A, Halder UC, Sarkar S, Kobayashi N, Komoto S, Taniguchi K, Chawla-Sarkar M. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. *J. Virol.* 2010;84(13):6834–6845.
22. Arnold MM, Patton JT. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J. Virol.* 2011;85(5):1970–1979.
23. Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of  $\beta$ -TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 2009; 1-12
24. Bagchi P, Bhowmick R, Nandi S, Kant Nayak M, Chawla-Sarkar M. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFkB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology.* 2013;444(1-2):41–44.
25. Qin L, Ren L, Zhou Z, Lei X, Chen L, Xue Q, Liu X, Wang J, Hung T. Rotavirus nonstructural protein 1 antagonizes innate immune response by interacting with retinoic acid inducible gene I. *Virol. J.* 2011;8(1):526.
26. Sen A, Rott L, Phan N, Mukherjee G, Greenberg HB. Rotavirus NSP1 Protein Inhibits Interferon-Mediated STAT1 Activation. *J. Virol.* 2014;88(1):41–53.
27. Holloway G, Truong TT, Coulson BS. Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *J. Virol.* 2009;83(10):4942–4951.
28. Taraporewala ZF, Jiang X, Vasquez-Del Carpio R, Jayaram H, Prasad BVV, Patton JT. Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system. *J. Virol.* 2006;80(16):7984–7994.

29. Criglar JM, Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Broughman JR, Prasad BV, Estes MK. A Novel Form of Rotavirus NSP2 and Phosphorylation-Dependent NSP2-NSP5 Interactions Are Associated with Viroplasm Assembly. *J. Virol.* 2014;88(2):786–798.
30. Chung KT, McCrae MA. Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. 2011;3:2197–2203.
31. Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 2006;80(18):9031–9038.
32. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, López S. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* 2011: 12594-12604.
33. Bergmann CC, Maass D, Poruchynsky S, Atkinson PH, Bellamy AR. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1989;8(6):1695–1703.
34. Hyser J, Collinson-Pautz M, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio.* 2010;1(5):1–11.
35. González RA, Espinosa R, Romero P, López S, Arias CF. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* 2000:1963–1973.
36. Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK. Rotavirus NSP4 Induces a Novel Vesicular Compartment Regulated by Calcium and Associated with Viroplasms. *J. Virol.* 2006;80(12):6061–6071.
37. Crawford SE, Hyser JM, Utama B, Estes MK. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$  signaling is required for rotavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(50):3405–3413.
38. Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J. Virol.* 1989;63(11):4553–4562.
39. Contin R, Arnoldi F, Campagna M, Burrone OR. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J. Gen. Virol.* 2010:1782–1793.
40. Martínez MA, López S, Arias CF, Isa P. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J. Virol.* 2013;87(2):1115–1122.
41. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, Morrow A, Jiang X. Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* 2012;86(9):4833–4843.
42. Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinoza R, Arias CF, López S. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 2010;84(18):9161–9169.

43. Sánchez-San Martín, López T, Arias CF, López S. Characterization of Rotavirus Cell Entry. *J. Virol.* 2004;78(5):2310–2318.
44. Guglielmi KM, McDonald SM, Patton JT. Mechanism of Intraparticle Synthesis of the Rotavirus Double-stranded RNA Genome. *J Biol Chem.* 2010;285(24):18123–18128.
45. Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J. Virol.* 1997;71(11):8268–8278.
46. González RA, Espinosa R, Romero P, López S, Arias CF. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Br. Report. Arch. Virol.* 2000:1963–1973.
47. Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* 2004;85(3):625–634.
48. Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR. Two non-structural rotavirus proteins , NSP2 and NSP5 , form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* 1999:333–339.
49. Mohan KV, Muller J, Som I, Atreya CD. The N- and C-Terminal Regions of Rotavirus NSP5 Are the Critical Determinants for the Formation of Viroplasm-Like Structures. *J. Virol.* 2003. 12184-12192
50. Arnoldi F, Campagna M, Eichwald C, Desselberger U, Burrone OR. Interaction of Rotavirus Polymerase VP1 with Nonstructural Protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J. Virol.* 2007;81(5):2128–2137.
51. Cheung W, Gill M, Esposito A, Kamininski CF, Courousse N, Chwetzoff S, Trugnan G, Keshavan N, Lever A, Desselberger U. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J. Virol.* 2010;84(13):6782–6798.
52. Kim Y, Chang KO. Inhibitory Effects of Bile Acids and Synthetic Farnesoid X Receptor Agonists on Rotavirus Replication. *J. Virol.* 2011;85(23). 12570-12577.
53. Gaunt ER, Zhang Q, Cheung W, Wakelam MJ, Lever AM, Desselberger U. Lipidome analysis of rotavirus-infected cells confirms the close interaction of lipid droplets with viroplasms. *J. Gen. Virol.* 2013;94(7):1576–1586.
54. Zambrano JL, Ettayebi K, Maaty WS, Faunce NR, Bothner B, Hardy ME. Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virol. J.* 2011;8:359.
55. Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 2009;5(1):e1000280.
56. Martin D, Duarte M, Lepault J, Poncet D. Sequestration of Free Tubulin Molecules by the Viral Protein NSP2 Induces Microtubule Depolymerization during Rotavirus Infection. 2010;84(5):2522–2532.

57. Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, Patton JT, Harrison SC. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure*. 2008;16(11):1678–1688.
58. Zeng CQ, Estes MK, Charpilienne A, Cohen J. The N Terminus of Rotavirus VP2 Is Necessary for Encapsidation of VP1 and VP3. *Microbiology*. 1998;72(1):201–208.
59. McDonald SM, Patton JT. Rotavirus VP2 Core Shell Regions Critical for Viral Polymerase Activation. *J. Virol*. 2011;85(April):3095–3105.
60. López T, Silva-Ayala D, López S, Arias CF. Replication of the Rotavirus Genome Requires an Active Ubiquitin-Proteasome System. *J. Virol*. 2011;85(22):11964–11971.
61. Xu G, Sztalryd C, Londos C. Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1761(1):83–90.
62. Lai M. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology*. 1998;12:1–12.
63. Arnoldi F, Campagna M, Eichwald C, Desselberger U, Burrone OR. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J. Virol*. 2007;81(5):2128–2137.
64. Bang Y, Kang BY, Choi HJ. Preconditioning stimulus of proteasome inhibitor enhances aggresome formation and autophagy in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2014. 263–268.