



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DETERMINACIÓN DEL PAPEL DEL TRANSPORTE VESICULAR ENTRE EL
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y EL APARATO DE GOLGI EN LA
REPLICACIÓN DE ROTAVIRUS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ana Cristina Sánchez Sánchez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz
Instituto de biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez (IBT-UNAM)
Dr. Ramón González García-Conde (CIDC, UAEM)

Cuernavaca, Morelos

Febrero, 2018



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.

JURADO

Presidente	Dr. Jean Louis Charli Casalonga
Secretario	Dr. Ernesto Ortiz Suri
Vocal	Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano
Vocal	Dr. Juan Ernesto Ludert León
Vocal	Dra. María del Carmen Beltrán Núñez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz. Durante la realización de la presente se contó con una beca otorgada por CONACYT y con apoyo económico de los donativos CONACYT 153639 y 221019. También, se contó con apoyo del PAEP para la asistencia al X Congreso Nacional de Virología.

A mis padres, Amalia y Felipe

ÍNDICE

ÍNDICE	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN.....	v
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Rotavirus	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Estructura del virión	1
1.1.3 Ciclo de replicación	3
1.2 Transporte vesicular intracelular	5
1.2.1 Vía secretora	5
1.2.1.1 Transporte anterógrado	7
1.2.3 Rab GTPasas	10
2.0 ANTECEDENTES.....	11
3.0 HIPOTESIS.....	14
4.0 OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos particulares	15
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
5.1 Células y virus.....	16
5.2 Anticuerpos y plásmidos	16
5.3 Lipofección de siRNAs	17
5.4 Expresión de dominantes negativas.....	17
5.5 Ensayos de infectividad	17
5.6 Inmunofluorescencia.....	18
5.7 Western blot.....	19
5.8 Ensayos de transporte.....	19
5.9 Colocalización de la proteína tsVSVG-GFP con marcadores celulares.....	20
6.0 RESULTADOS.....	21
6.1 Efecto del silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 sobre la infectividad de la cepa bovina de rotavirus UK.....	21

6.2 Ensayo de mutantes dominantes negativas.....	25
6.3 Ensayos de transporte de la proteína termosensible VSVG-GFP.....	26
6.4 Determinación de la localización intracelular de la proteína tsVSVG-GFP	32
7.0 DISCUSIÓN	37
8.0 CONCLUSIONES	42
9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura de rotavirus.....	2
Figura 2.- Ciclo de replicación de rotavirus.....	4
Figura 3.- Esquema general del transporte vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.....	6
Figura 4.- El ensamblado de COPI y COPII media la formación de vesículas.....	8
Figura 5.- Formación, transporte y fusión de las vesículas de COPII.....	9
Figura 6.- Ruta de entrada de las cepas de rotavirus RRV, UK y nar3 en células MA104.....	12
Figura 7.- Efecto del silenciamiento de Rab1a sobre la infectividad de la cepa de rotavirus UK.....	22
Figura 8.- Efecto del silenciamiento de Rab2 en la infectividad de la cepa de rotavirus UK.....	23
Figura 9.- Efecto del silenciamiento de Sec13 en la infectividad de la cepa de rotavirus UK.....	24
Figura 10.- Expresión de mutantes dominantes negativas de Rab1a y Rab2 y su efecto sobre la infectividad de la cepa UK.....	26
Figura 11.- Transporte de la proteína termosensible VSVG-GFP (tsVSVG-GFP) en células MA104.....	28
Figura 12.- Efecto del silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 sobre la distribución de la proteína termosensible VSVG-GFP.....	29
Figura 13.- Efecto de la expresión de mutantes dominantes negativas de Rab1a y Rab2 sobre la distribución de la proteína tsVSVG-GFP en células MA104.....	31
Figura 14.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab1a no co-localiza con KDEL.....	33
Figura 15.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab2 no co-localiza con KDEL.....	34
Figura 16.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab1a co-localiza con GM130.....	35
Figura 17.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab2 co-localiza con GM130.....	36

ABREVIATURAS

RV	Rotavirus
EE	Endosomas tempranos, acrónimo de su nombre en inglés <i>Early Endosomes</i>
ME	Endosomas en maduración, acrónimo de su nombre en inglés <i>Maturing Endosomes</i>
LE	Endosomas tardíos, acrónimo de su nombre en inglés <i>Late Endosomes</i>
RE	Retículo endoplásmico
DN	Mutante dominante negativa
siRNA	RNA interferente pequeño
hpt	Horas post-transfección
hpi	Horas post-infección
tsVSVG-GFP	Proteína G del virus de la estomatitis vesicular, termosensible y fusionada a GFP
ERGIC	Compartimento intermedio del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, acrónimo de su nombre en inglés <i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
COP I	Complejo de proteínas de cubierta I, acrónimo de su nombre en inglés <i>Coatamer Protein I</i>
COP II	Complejo de proteínas de cubierta II, acrónimo de su nombre en inglés <i>Coatamer Protein II</i>
SNARE	Receptor de proteínas de unión al factor soluble sensible a N-etilmaleimida, acrónimo de su nombre en inglés <i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Protein Receptor</i>
UK	Cepa bovina de rotavirus UK
RRV	Cepa de rotavirus aislada de mono <i>Rhesus</i>
CD-M6PR	Receptor de manosa-6-fosfato

RESUMEN

Introducción. Rotavirus (RV) es uno de los principales agentes etiológicos causantes de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años. Utilizando la tecnología de interferencia del RNA (RNAi) un tamizaje primario sugirió que el silenciamiento de genes involucrados en el transporte vesicular entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi presuntamente tenía efecto sobre la infectividad de cepas de RV de penetración tardía y dependientes de catepsinas. El objetivo de este estudio fue determinar si el transporte vesicular que ocurre entre el RE y el aparato de Golgi es necesario para la entrada de cepas de RV dependientes de catepsinas. **Métodos.** Los genes Rab1a, Rab2 y Sec13 se silenciaron utilizando un método de transfección reversa de siRNA. Se expresaron mutantes dominantes negativos (DN) de Rab1a y Rab2 como estrategia alternativa para evaluar el efecto sobre la infectividad. La infectividad de RV se determinó cuantificando el número de unidades formadoras de focos infecciosos. La eficiencia de silenciamiento por los siRNA se verificó mediante western-blot. La inhibición del transporte entre RE y Golgi se demostró utilizando la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) fusionada a GFP como marcador de transporte. **Resultados.** El silenciamiento del gen Rab1a provocó la disminución de la infectividad de la cepa bovina de rotavirus UK en un 40%. Sin embargo, la infectividad en células silenciadas en los genes Rab2 y Sec13 no mostró ninguna disminución. La expresión de la DN de Rab1a no provocó disminución en la infectividad comparada con células expresando la proteína Rab1a silvestre. Por otro lado, la expresión de la DN de Rab2 provocó una disminución de hasta el 50%. En contraste con el fenotipo silvestre encontrado a 32°C, donde la proteína tsVSVG-GFP se observó concentrada en una ubicación perinuclear, en las células silenciadas, o que expresan DN, la proteína tsVSVG-GFP se observó distribuida en la célula a modo de un puntilleo fino. Al utilizar marcadores de RE y de aparato de Golgi se pudo determinar que el puntilleo fino observado co-localizó con el aparato de Golgi. **Conclusiones.** Rab1a y Rab2 se requieren durante el ciclo de replicación de la cepa bovina de rotavirus UK. La inhibición de Rab1a, Rab2 y Sec13 en células MA104 no provoca la disrupción del transporte anterógrado pero sí provoca la desintegración del aparato de Golgi. La función de Rab1a y de Rab2 que es necesaria durante el ciclo de replicación de rotavirus es independiente de sus funciones en el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Rotavirus

1.1.1 Generalidades

Rotavirus (RV) es uno de los principales agentes etiológicos causantes de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años. En el 2008 la Organización Mundial de la Salud estimó 453,000 muertes por diarrea infecciosa atribuida a rotavirus, cifra que representa el 37% de las muertes por diarrea y el 5% del total de muertes en ese grupo etario (Tate *et al.*, 2012). La vacunación ha sido una medida de prevención efectiva que ha reducido la morbilidad y mortalidad de la infección por rotavirus en países desarrollados. Sin embargo, la efectividad de la vacuna es menor en países subdesarrollados donde rotavirus representa un problema de salud pública importante (Yen *et al.*, 2014). En México, la introducción de la vacuna de rotavirus en 2007 ha reducido aproximadamente el 53% de las muertes por gastroenteritis en menores de 5 años (Sánchez-Uribe *et al.*, 2016). Un mejor conocimiento de los procesos virales y celulares que participan durante la infección podría permitir el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la infección y/o controlar el cuadro diarreico producido.

1.1.2 Estructura del virión

La partícula infecciosa de rotavirus está conformada por tres capas concéntricas de proteína (TLP, del inglés *triple-layered particle*) que confinan al genoma viral compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena. Este genoma codifica para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) (Estes *et al.*, 2013).

La capa más interna del virión está constituida por 60 dímeros de la proteína VP2 en un arreglo icosaédrico T=1. La proteína VP1 con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, la proteína VP3 con actividad de guanilil-transferasa y metilasa, así como el genoma viral se encuentran asociados a la cara interna de esta capa formando el core del virión, también conocido como

partícula de una capa o SLP (del inglés *single-layer particle*) (Estes *et al.*, 2013).

Una capa de 260 trímeros de la proteína VP6 rodea al core del virión formando la partícula de doble capa (DLP, del inglés *double-layered particle*). Por último, la capa externa está compuesta por 260 trímeros de la glicoproteína VP7 que se ensamblan formando una superficie lisa, con una simetría icosaédrica T=13 de la cual se proyectan 60 espículas formadas por trímeros de la proteína VP4 (Estes *et al.*, 2013).

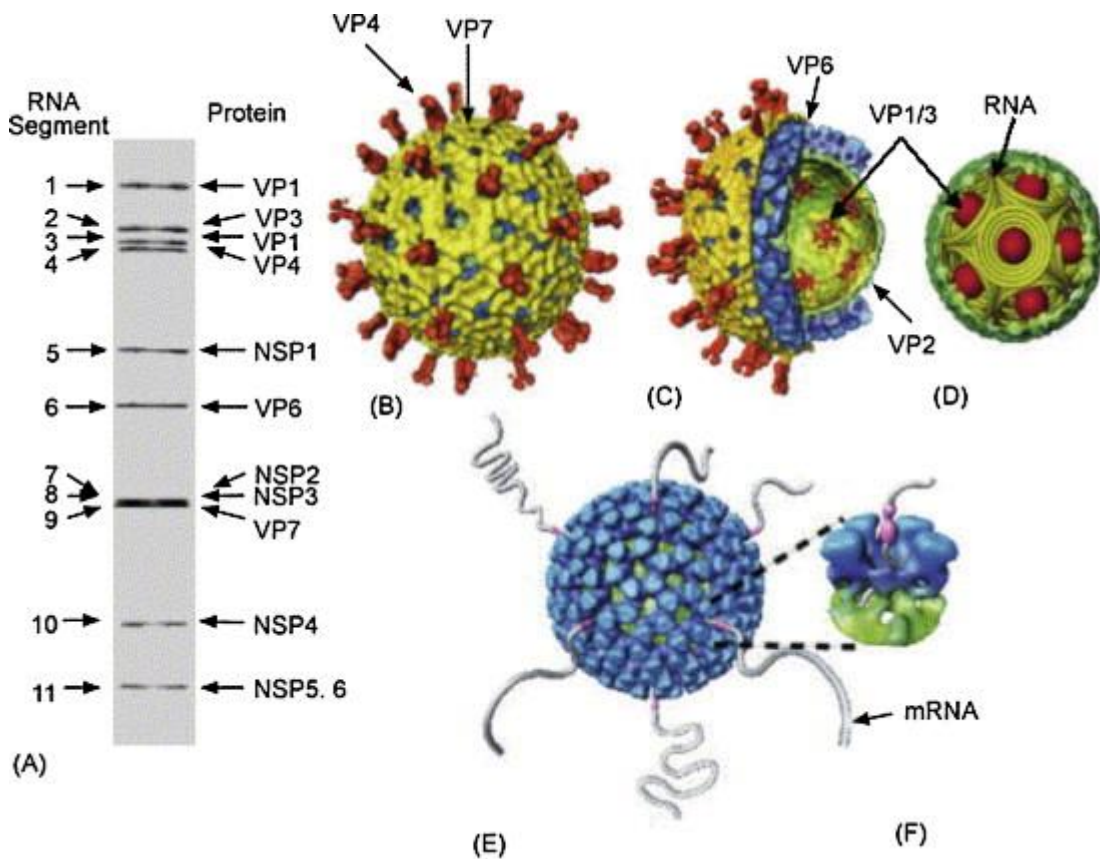


Figura 1.- Estructura de rotavirus. A) Perfil electroforético del genoma de rotavirus, se numeran a la izquierda los fragmentos de dsRNA y a la derecha las proteínas que codifican. B) Esquema de la TLP de rotavirus obtenida por reconstrucción de imágenes generadas por criomicroscopía electrónica, nótese la capa de trímeros de VP7 en amarillo y las espículas de VP4 en naranja. C) Corte de una TLP donde se observa la capa externa (amarillo/naranja), la capa intermedia (azul) y la capa interna (verde). D) Organización del genoma viral en conos invertidos que rodean a los complejos replicativos dentro del core del virion (SLP). E) DLP de rotavirus transcripcionalmente activa (Jayaram *et al.*, 2004).

1.1.3 Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de rotavirus (Figura 2) comienza con la unión de la partícula viral infecciosa a la superficie celular a través de la interacción inicial entre la proteína VP4 y receptores que contienen ácido siálico en posición terminal o subterminal (Dormitzer *et al.*, 2002). Varias moléculas de la superficie celular, como las integrinas y proteínas de uniones estrechas, pueden actuar entonces como co-receptores post-unión (Gutiérrez *et al.*, 2010; Torres-Flores *et al.*, 2015; Revisado en López & Arias, 2004).

Una vez unido a la superficie de la célula, el virus entra por endocitosis, la cual, dependiendo de la cepa, puede ser dependiente o independiente de clatrina (Figura 2a) (Gutiérrez *et al.*, 2010; Sánchez-San Martín *et al.*, 2004). Independientemente del tipo de receptor y de la vía de endocitosis utilizada, las TLPs internalizadas tienen como destino común los endosomas tempranos (EE) y posteriormente los endosomas en maduración (ME); sin embargo, después de este punto el tráfico intracelular de las distintas cepas de RV es diferente. Algunas cepas pierden la capa externa y se liberan hacia el citoplasma a nivel de los MEs, mientras que otras requieren de las condiciones de los LEs para llegar al citosol (Figura 2b) (Díaz-Salinas *et al.*, 2014).

La vía de endocitosis utilizada no condiciona el tráfico intracelular a seguir. Por ejemplo, las cepas de rotavirus SA-11 y UK se internalizan a través de la misma vía endocítica (mediada por clatrina), pero escapan del compartimento vesicular a diferentes niveles; SA-11 ingresa al citosol desde MEs, mientras que la cepa UK lo hace desde endosomas tardíos (LEs) (Díaz-Salinas *et al.*, 2014).

Durante su liberación de los compartimentos vesiculares hacia el citoplasma, las TLPs pierden la capa externa generándose DLPs que son transcripcionalmente activas. El RNA genómico se transcribe dentro de las DLPs, y los mRNA virales son liberados de la partícula a través de canales existentes en ésta (Lawton *et al.*, 1997). Los transcritos son utilizados para la síntesis de proteínas virales así como de molde para la replicación del genoma (Figura 2c y 2d).

La mayoría de las proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP6) y algunas proteínas virales no estructurales (NSP2 y NSP5) recién sintetizadas interactúan en una zona electrodensa al microscopio electrónico, denominada viroplasma. En los viroplasmos se efectúa la replicación del genoma y se lleva a cabo el ensamblado de las nuevas DLPs (Figura 2e), las cuales geman hacia el retículo endoplásmico (RE) (Estes *et al.*, 2013).

Durante el proceso de gemación las DLPs adquieren una cubierta de lípidos, dando lugar a partículas intermediarias envueltas que al perder la capa lipídica y ensamblar la capa proteica externa dan origen, en el lumen del RE, a las partículas maduras infecciosas de tres capas (Figura 2f). Los virus maduros se liberan de la célula por lisis o por una vía no lítica actina-dependiente (Estes *et al.*, 2013; Trejo-Cerro *et al.*, 2017)

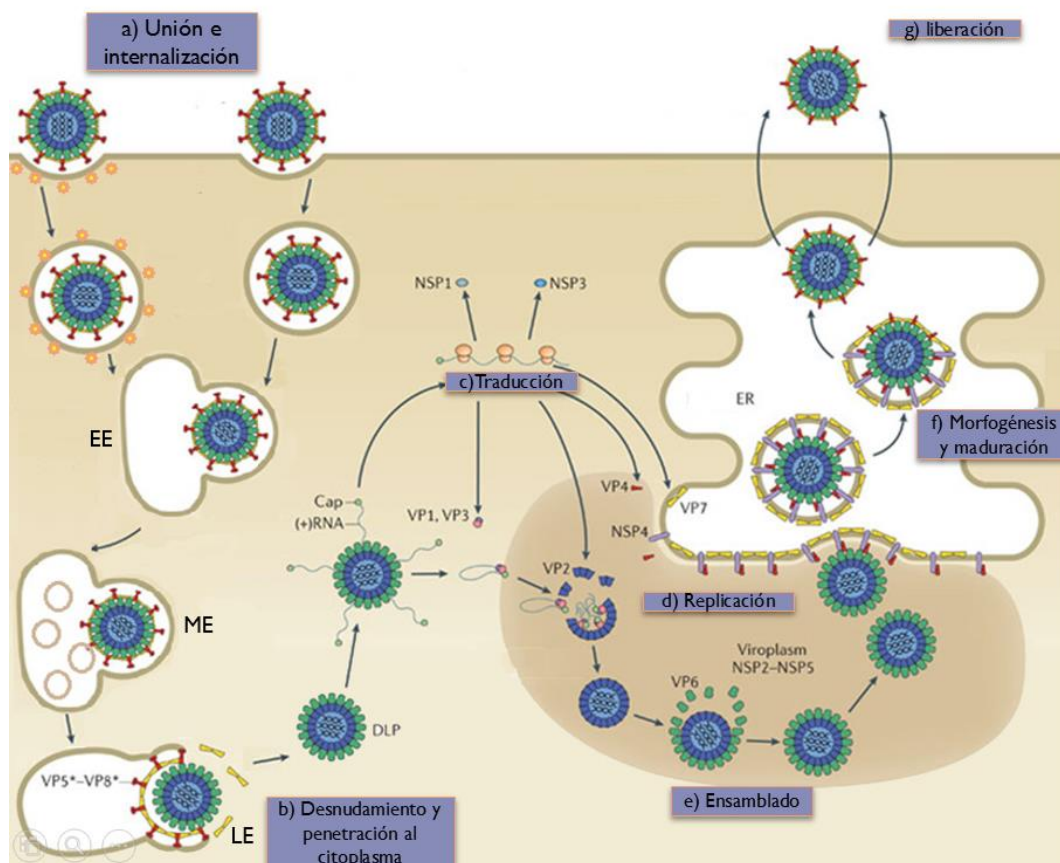


Figura 2.- Ciclo de replicación de rotavirus. El virión de rotavirus se une a la superficie celular a través de receptores celulares en la membrana. Una vez unido se internaliza por diversas vías endocíticas hacia los endosomas, a partir de los cuales se libera al citoplasma en forma de DLPs transcripcionalmente activas. Los transcritos se utilizan tanto para la síntesis de proteínas virales como de molde para la replicación del genoma. Las proteínas virales y los RNAs recién sintetizados interactúan en el viroplasma, donde se lleva a cabo el ensamblado de las nuevas DLPs las cuales

geman hacia el RE. En el RE las DLP adquieren la tercera capa proteica y las TLP maduras se liberan por exocitosis o lisis celular para iniciar un nuevo ciclo de replicación. (Modificado de Trask *et al.*, 2012)

1.2 Transporte vesicular intracelular

El transporte vesicular intracelular es un proceso que permite la movilización eficiente y dirigida de los diversos componentes celulares. Este proceso es altamente regulado pues controla la arquitectura de los diferentes compartimentos intracelulares y permite la comunicación de la célula con su entorno y entre sus diferentes compartimentos (Alberts *et al.*, 2002).

En general, las vesículas se originan en un compartimento donador con ayuda de proteínas de cubierta y adaptadoras. Estas vesículas son dirigidas y fusionadas con el compartimento aceptor en un proceso de acoplamiento dirigido gracias a la especificidad conferida por proteínas de unión y fusión (Tokarev *et al.*, 2009).

El transporte vesicular puede agruparse en dos grandes vías: la vía endocítica que transporta cargos del exterior al interior de la célula y la vía exocítica o secretora en la que se transportan cargos recién sintetizados a los diferentes compartimentos celulares, a la membrana plasmática o bien son secretados al medio extracelular (Alberts *et al.*, 2002).

1.2.1 Vía secretora

En general, una tercera parte de las proteínas de una célula tienen como destino final las membranas celulares o el medio extracelular donde llevan a cabo su función. En eucariotes, una red de organelos interconectados conforman la vía secretora (Revisado en Gomez-Navarro & Miller, 2016).

El transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi es el primer evento en la vía secretora. Las vesículas mediante las cuales se efectúa este transporte pueden ser clasificadas de acuerdo a las proteínas de cubierta que las generan. Las proteínas de cubierta son proteínas citoplásmicas que efectúan dos funciones principales; la primera es favorecer la deformación de las membranas durante la formación de las vesículas, la segunda consiste en seleccionar los cargos específicos que contendrá la vesícula.

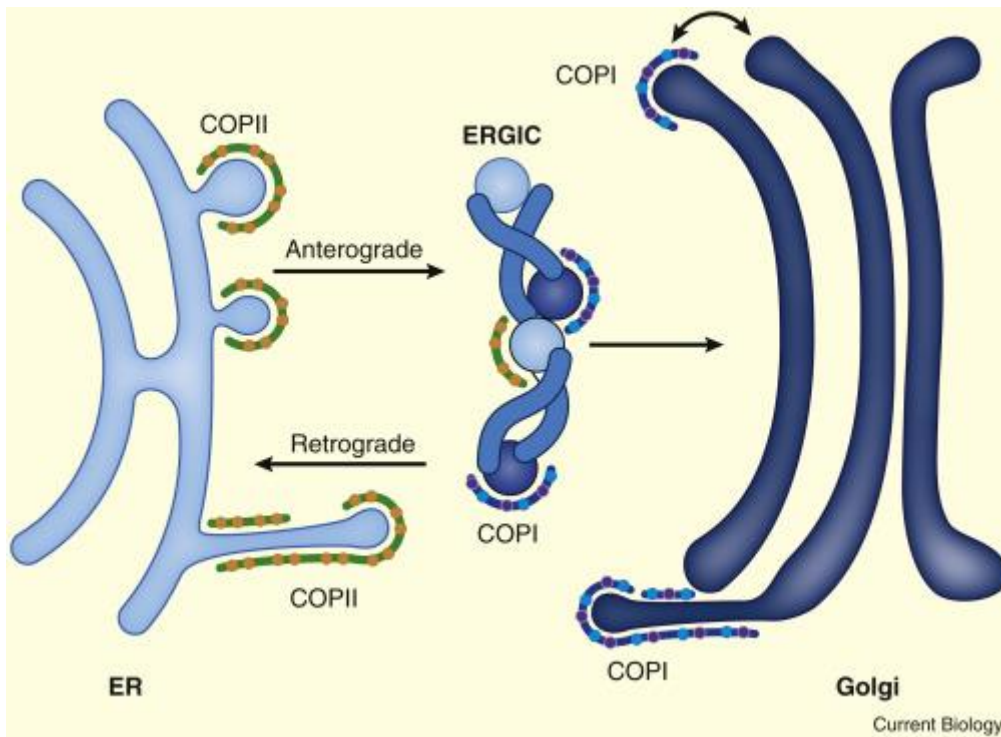


Figura 3.- Esquema general del transporte vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El transporte anterógrado involucra la formación de vesículas recubiertas por el complejo proteico COPII a partir del retículo endoplásmico; estas vesículas transportan las proteínas cargo hacia el compartimento intermedio del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (ERGIC) y finalmente al aparato de Golgi. El complejo proteico COPI genera vesículas en el aparato de Golgi o el ERGIC, estas vesículas mediarán el transporte retrógrado de proteínas cargo residentes hacia el retículo endoplásmico (Revisado en Gómez-Navarro & Miller, 2016).

La formación de vesículas a partir del RE está mediada por el complejo proteico COPII; una vez formadas las vesículas son transportadas hacia el compartimento intermedio RE-Golgi, denominado ERGIC, o directamente hacia el aparato de Golgi mediante el transporte anterógrado. El complejo proteico COPI media la formación de vesículas que transportan cargos del aparato de Golgi al RE y el transporte entre las cisternas del aparato de Golgi; este transporte es denominado transporte retrógrado (Figura 3) (Revisado en Gómez-Navarro & Miller, 2016).

1.2.1.1 Transporte anterógrado

Las proteínas cargo que se traslocaron al RE durante su síntesis y que se encuentran plegadas correctamente, son empacadas durante el transporte anterógrado dentro de vesículas recubiertas por el complejo proteico COPII (Alberts *et al.*, 2002). COPII está conformado por cinco subunidades: Sar1, heterodímeros de Sec23 y Sec24, así como heterotetrámeros de Sec13 y Sec31 (Barlowe *et al.*, 1994).

La formación de la vesícula comienza cuando la proteína citosólica Sar1 es activada por la proteína residente de membrana de retículo endoplásmico Sec12; la forma activa de Sar1 unida a GTP se relocaliza a RE y una vez ahí recluta los heterodímeros de Sec23/Sec24. Sec24 interacciona directamente o a través de adaptadores con las proteínas cargo que se transportaran en la vesícula, posteriormente los heterotetrámeros de Sec13/Sec23 son reclutados por Sar1 y son los responsables de generar la curvatura de membrana necesaria para la formación de la vesícula esférica (Figura 4) (Revisado en Gómez-Navarro & Miller, 2016). Este proceso de empaquetado proteico dentro de las vesículas parece ser un proceso selectivo, algunas proteínas cargo se reclutan activamente dentro de las vesículas al poseer señales de transporte en su superficie que son reconocidas por receptores complementarios presentes en las vesículas y los cuales interaccionan al mismo tiempo con los componentes del complejo COPII. En índices mucho menores, proteínas que carecen de señales de transporte, y cuya función se lleva a cabo en el RE, se reclutan a las vesículas de manera inespecífica (Tokarev *et al.*, 2009).

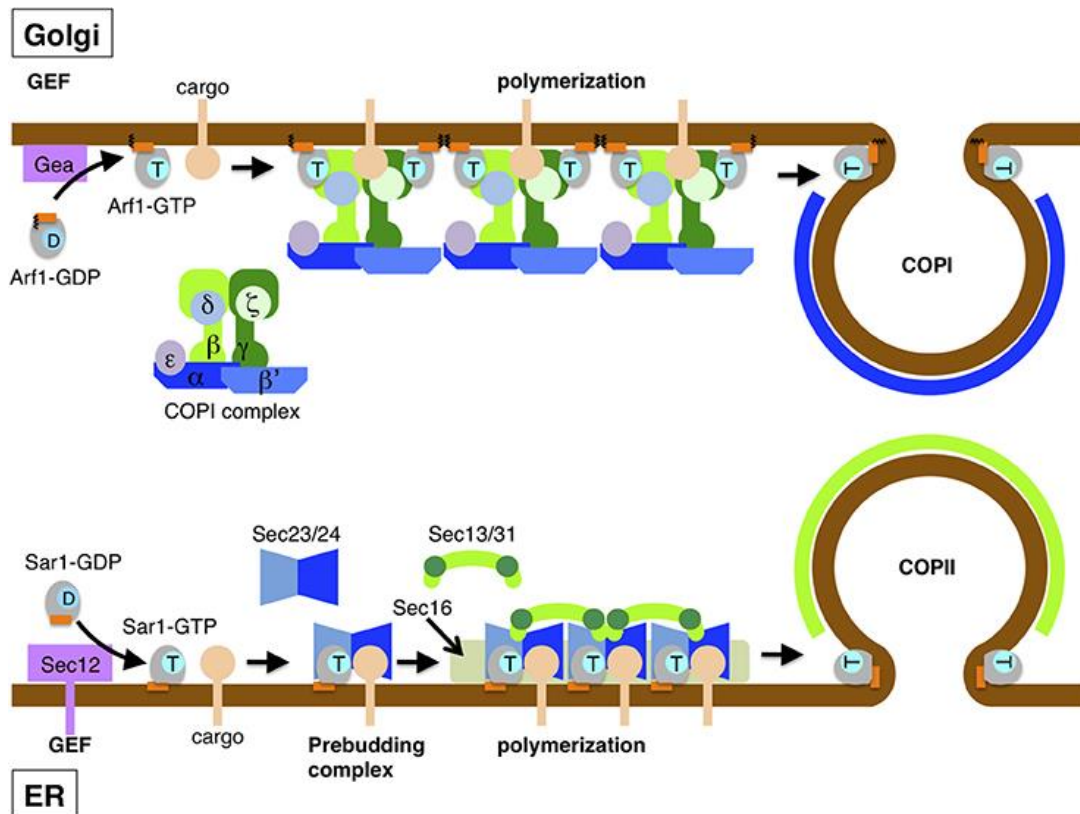


Figura 4.- El ensamblado de COPI y COPII media la formación de vesículas. La formación de la vesícula comienza con la relocalización del activador Sar1 o Arf1 a la membrana del retículo endoplásmico o del aparato de Golgi, respectivamente. Las diferentes subunidades de los complejos COPII o COPI son reclutadas de manera secuencial a la membrana del organelo donador, esto permite la deformación de la membrana y finalmente la formación de las vesículas conteniendo los cargos a transportar (Yorimitsu *et al.*, 2014).

Una vez formada, la vesícula es transportada hasta el organelo receptor a través de microtúbulos con la ayuda de proteínas motoras. Sar1 se libera de la membrana de la vesícula y esto permite la unión del complejo TRAPPI el cual interacciona con la pequeña GTPasa Rab1a en su forma activa unida a GTP, esta última recluta a la proteína p115. En el aparato de Golgi la proteína de unión GM130 forma un complejo con GRASP65 y otras proteínas residentes del cis-Golgi, este complejo interacciona con p115 lo que permite la unión y fusión de la vesícula con el aparato de Golgi (Figura 5) (Moyer *et al.*, 2001).

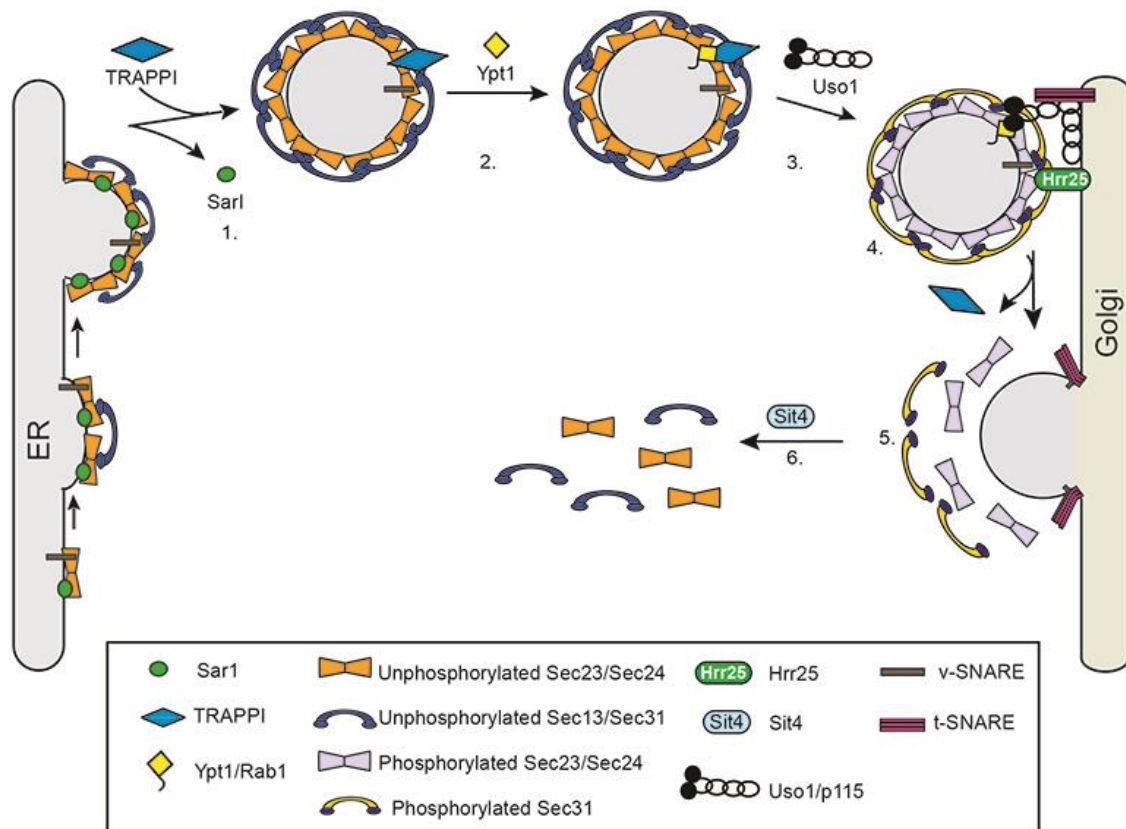


Figura 5.- Formación, transporte y fusión de las vesículas de COPII. Una vez que la vesícula se forma por la nucleación de COPII, la fosforilación de Sar1 provoca que esta se desprenda de la membrana de la vesícula y el complejo TRAPPI se integre a la misma (1). En células de mamífero, el complejo TRAPPI interacciona con la Rab1a-GTP (2) que a su vez recluta a la proteína de unión p115 (3). P115 interacciona con diversas proteínas residentes en el aparato de Golgi permitiendo así la unión y fusión de la vesícula en el cis-Golgi (4) (Revisado en Davis & Ferro-Novick, 2015).

1.2.1.2 Transporte retrógrado

El aparato de Golgi es el principal compartimento distribuidor de la célula; las vesículas generadas en este organelo pueden transportarse a la membrana plasmática, a otros organelos como los endosomas, o incluso de retorno al RE (transporte retrógrado). Las proteínas residentes de un organelo que se mueven durante la vía secretora al siguiente organelo tienen que ser recicladas y retornar al compartimento original para mantener la identidad del compartimento y poder ser utilizadas de nuevo en el transporte (Tokarev et al, 2009). El transporte retrógrado del aparato de Golgi al RE también asegura el retorno eficiente de cargos inmaduros o proteínas residentes del RE que fueron empaquetadas de manera no selectiva durante el transporte anterógrado (Revisado en Gómez-Navarro & Miller, 2016). El transporte

retrógrado del aparato de Golgi al RE está mediado por vesículas recubiertas por el complejo proteico COPI. El complejo COPI está conformado por siete subunidades (α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ).

1.2.3 Rab GTPasas

Las Rab GTPasas son una amplia familia de GTPasas pequeñas coordinadoras del tráfico vesicular. Estas proteínas funcionan como *switches* moleculares que alternan entre dos estados conformacionales, un estado activo asociado a GTP y un estado inactivo asociado a GDP. El estado GTP-activo interacciona con diversas proteínas de cubierta, proteínas motoras y SNAREs controlando así la gemación, identidad, movilización y fusión de las vesículas. La interacción de las diversas GTPasas de manera específica (más de 60 en mamíferos) asegura la regulación espaciotemporal del tráfico vesicular (Stenmark, 2009).

2.0 ANTECEDENTES

Los avances en la caracterización del tráfico intracelular que sigue RV desde su internalización a la célula hasta la liberación de las DLPs al citoplasma han permitido determinar la importancia de varios componentes celulares involucrados en la regulación del mismo (Díaz-Salinas *et al.*, 2014; Silva-Ayala *et al.*, 2013).

Utilizando la tecnología de interferencia del RNA (siRNA), recientemente se llevó a cabo en nuestro laboratorio un tamizaje de 144 genes celulares involucrados en el transporte intracelular para evaluar su posible relevancia en la infección de tres cepas de rotavirus: RRV, nar3 y UK. El tráfico intracelular de estas tres cepas es diferente (Figura 6). Una vez endocitadas las partículas virales, las tres cepas convergen en los EEs que durante su proceso de maduración (MEs), presentan las condiciones necesarias para que RRV se libere hacia el citoplasma, mientras que UK y nar3 requieren de las condiciones de los LEs para su liberación al citosol (Díaz-Salinas *et al.*, 2014; Silva-Ayala *et al.*, 2013). Sin embargo, los requisitos para la liberación de nar3 y UK de los LEs son diferentes. UK requiere del transporte de catepsinas desde el trans-Golgi hacia los LEs, mediado por el receptor de manosa-6-fosfato (CD-M6PR), mientras que nar3 no depende de este transporte (Díaz-Salinas *et al.*, 2014).

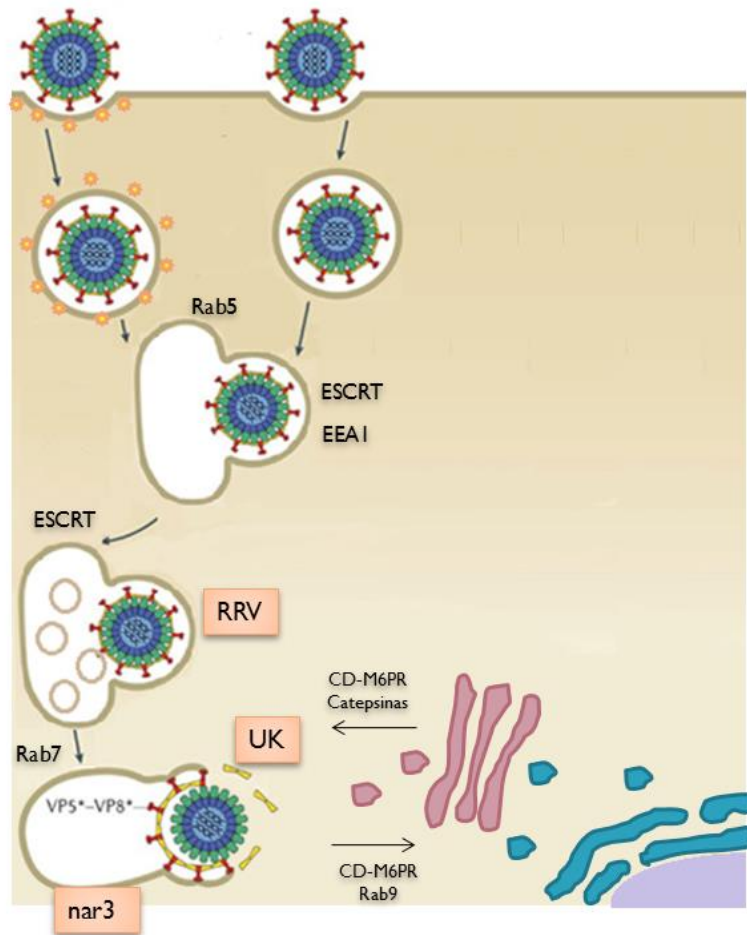


Figura 6.- Ruta de entrada de las cepas de rotavirus RRV, UK y nar3 en células MA104. El virión de las diferentes cepas de rotavirus se une a la superficie celular a través de receptores y co-receptores celulares en la membrana. Una vez unido a la superficie celular, el virus entra por endocitosis, la cual, según la cepa, puede ser dependiente o independiente de clatrina. Independientemente del tipo de receptor y de la vía de endocitosis utilizada, las TLPs internalizadas tienen como destino común los endosomas tempranos, durante su proceso de maduración los endosomas presentan las condiciones necesarias para que RRV se libere hacia el citoplasma, mientras que UK y nar3 requieren de las condiciones de los endosomas tardíos para su liberación al citosol. UK requiere del transporte de catepsinas desde el trans Golgi hacia los LEs, mediado por el receptor de manosa-6-fosfato (CD-M6PR), mientras que nar3 no depende de este transporte (Modificado de Díaz-Salinas *et al.*, 2014; Silva-Ayala *et al.*, 2013).

El tamizaje primario realizado sugirió que el silenciamiento de los genes Rab1a, Rab2 y Sec13 afecta la infectividad de la cepa UK, pero no muestra efecto en las cepas nar3 y RRV (Silva-Ayala, datos no publicados). Rab1a y Rab2 pertenecen a la familia de las Rab GTPasas pequeñas. El análisis bioquímico y mutacional de Rab1a y Rab2 ha demostrado que son necesarias para el transporte anterógrado y retrógrado entre el RE y el aparato de Golgi; cuando su actividad es defectuosa las proteínas de exportación se acumulan

a nivel de RE (Tisdale *et al.*, 1992). La proteína Sec13 forma parte del complejo proteico de recubrimiento requerido para que las vesículas formadas en RE (COPII) sean transportadas a Golgi; su función en este complejo consiste en favorecer la curvatura de la membrana facilitando la formación de la vesícula; sin embargo, mutantes carentes en Sec13 son capaces de llevar a cabo el transporte normal de cierto tipo de moléculas (Copic *et al.*, 2012).

Durante la exocitosis temprana las proteínas recién sintetizadas en el RE son transportadas al aparato de Golgi, el cual se encarga de su distribución no sólo hacia la membrana plasmática sino también hacia endosomas, lisosomas y otros organelos (Presley *et al.*, 1997). Considerando lo anterior, la disminución de la infectividad de la cepa UK provocada por la inhibición de Rab1a, Rab2 y Sec13 podría deberse a la necesidad del transporte de algún compuesto celular desde el RE hasta algún punto en el tráfico vesicular del virus. Tanto nar3 como UK requieren de llegar a los LEs para su liberación al citoplasma; sin embargo, como se mencionó anteriormente, sólo UK, al igual que la mayoría de las cepas de RV que arriban hasta LEs, depende del CD-M6PR y de proteasas celulares como las catepsinas (Díaz-Salinas *et al.*, 2014), sugiriendo que durante la entrada de RV sólo las cepas dependientes de estos factores son afectadas al impedir el transporte RE-Golgi.

3.0 HIPÓTESIS

El transporte vesicular que ocurre entre el RE y el aparato de Golgi es necesario para la entrada de cepas de RV dependientes de catepsinas.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el papel del transporte vesicular que ocurre entre el RE y el aparato de Golgi en la entrada de rotavirus a la célula.

4.2 Objetivos particulares

- 1.- Definir el efecto del silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 sobre la infectividad de la cepa bovina de rotavirus UK.
- 2.- Determinar el efecto de la expresión de mutantes dominantes negativas de Rab1a y Rab2 sobre la infectividad de la cepa bovina de rotavirus UK.
- 3.- Comprobar la inhibición del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi en células MA104.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Células y virus

La línea celular MA104, proveniente de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), se cultivó en medio DMEM-RS (*Debecco's modified Eagle's minimal essential medium*) (Thermo Scientific) suplementado con 5% de suero fetal bovino en una atmósfera de CO₂ al 5% y 37°C. La cepa bovina de rotavirus UK (G6P[5]) fue donada por Y. Hoshino (NIAID, NIH, Bethesda, MD) (Feng *et al*, 2009) y propagada en células MA104 como se ha descrito previamente (Pando *et al*. 2002). Los lisados virales se activaron con tripsina (10 µg/mL) por 30 min a 37° C.

5.2 Anticuerpos y plásmidos

El anticuerpo monoclonal utilizado para detectar la proteína Rab1a fue de la marca Cell Signaling (Denvers, MA). Los anticuerpos policlonales dirigidos contra Rab2 y el epítipo c-myc exógeno fueron de la marca Abcam (Cambridge, MA). El anticuerpo policlonal usado para detectar la proteína Sec13 se adquirió de GeneTex, Inc. (Irvine, CA). Los sueros hiperinmunes de conejo para la detección de antígeno viral de rotavirus (α-TLPs) y de la proteína de citoesqueleto vimentina (α-Vim), se produjeron en nuestro laboratorio. Los anticuerpos policlonales α-conejo y α-ratón acoplados a peroxidasa fueron de la marca PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA). Los anticuerpos α-conejo y α-ratón acoplados al fluoróforo Alexa -488 o -568 así como el 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fueron de la marca Molecular Probes (Grand Island, NY). Los plásmidos PCMV-intron myc Rab1aWT, PCMV-intron myc Rab1a S25N, PCMV-intron myc Rab2WT y PCMV-intron myc Rab2 S20N fueron donados por Terry Hébert (McGill University). El plásmido pEGFP-VSVG fue amablemente proporcionado por Jennifer Lippincott-Schwartz (NIH, USA). Los pequeños RNAs de interferencia (siRNA) se adquirieron en Dharmacon-Thermo Scientific (Pittsburg, PA).

5.3 Lipofección de siRNAs

El silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 se realizó utilizando un método de transfección reversa sobre cubreobjetos de 5 mm en placas de 96 pozos (Gutierrez *et al.*, 2010). La oligofectamina (Invitrogen) se mezcló con MEM (*minimal essential medium*) sin suero y se incubó a 37°C por 10 min (15 µL de oligofectamina por 1 mL de MEM). Se adicionaron 8 µL del siRNA correspondiente (1 µM) a la mezcla de oligofectamina y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. La mezcla se colocó en los pozos correspondientes y se adicionaron 100 µL de una suspensión de células MA104 a una concentración de 1×10^5 cel/mL. Se utilizó siRNA "*non-targeting*" como un control irrelevante, así como siRNA dirigido contra la ATPv6 como control positivo. Las células se procesaron 72 horas post-transfección (hpt).

5.4 Expresión de dominantes negativas

Los plásmidos que codifican para las mutantes dominantes negativas y para las proteínas silvestres de Rab1a y Rab2 se lipofectaron mediante transfección reversa. La lipofectamina LTX (Invitrogen) se mezcló con medio MEM sin suero y se incubó a 37°C por 10 min. Se adicionó el plásmido correspondiente (500 ng) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. La mezcla final se adicionó a monocapas subconfluentes de células MA104 crecidas sobre cubreobjetos de 10 mm, se incubaron a 37°C por 6 h y posteriormente se intercambió la mezcla por MEM-RS.

5.5 Ensayos de infectividad

La infectividad de la cepa UK en células transfectadas con los siRNA se determinó por inmunofluorescencia. A las 72 hpt, las monocapas confluentes se lavaron con MEM sin suero y se infectaron con la cepa UK a una MOI de 3 por 1 h a 37°C. El inóculo se retiró y se incubaron las monocapas a 37°C con MEM sin suero. A las 6 horas post-infección (hpi) las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 2% por 20 min y se procesaron para

inmunofluorescencia. El suero hiperinmune de conejo para la detección de antígeno viral de rotavirus (α -TLPs) se utilizó como anticuerpo primario y el anticuerpo α -conejo acoplado al fluoróforo Alexa -568 se utilizó como anticuerpo secundario. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioskop 2, Alemania) acoplado a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ). Se cuantificó el número de células infectadas y se calculó la infectividad relativa (Silva-Ayala *et al.*, 2013).

Las células transfectadas con los plásmidos que codifican para las mutantes dominantes negativas y las proteínas silvestres de Rab1a y Rab2 se infectaron a las 24 hpt de la misma manera que las células transfectadas con los siRNA. A las 6 hpi las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 2% por 20 min y también se procesaron para inmunofluorescencia. Como anticuerpos primarios se utilizó α -TLPs así como el anticuerpo policlonal dirigido contra el epítipo c-myc exógeno. El anticuerpo α -conejo acoplado al fluoróforo Alexa-568 y el anticuerpo α -ratón acoplado al fluoróforo Alexa-488 se utilizaron como anticuerpos secundarios. La infectividad relativa se calculó contando un número fijo de células que expresaban la proteína silvestre o su versión DN y determinando las células infectadas en estas subpoblaciones.

5.6 Inmunofluorescencia

Las monocapas confluentes de células MA104 crecidas sobre cubreobjetos de vidrio se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 2% por 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces por 5 min con PBS-NH₄Cl 50 mM. Una vez lavadas las preparaciones se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS-NH₄Cl 50 mM) y posteriormente se permeabilizaron por 15 min a temperatura ambiente con 0.5% de Tritón X-100 (Sigma) diluido en solución de bloqueo. Las preparaciones se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados por 5 min con PBS-NH₄Cl 50 mM. Los anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a Alexa-568 se diluyeron también en solución de bloqueo y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados se adicionó DAPI

30 mM durante 15 min y se realizaron 6 lavados finales. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando solución Citifluor AF1 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield; USA) (Silva-Ayala *et al.*, 2013). Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioskop 2, Alemania) acoplado a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ).

5.7 Western blot

La eficiencia de silenciamiento por los siRNA se verificó mediante análisis de Western-blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra Rab1a, Rab2 y Sec13 (Dector *et al.*, 2002). Monocapas de células MA104 transfectadas con los siRNA (72 hpt) se lisaron utilizando amortiguador de carga (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% b-mercaptoetanol). Los lisados celulares se hirvieron durante 5 min y se analizaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12.5%. La electrotransferencia de proteínas se realizó durante 45 min a 130 mA en membranas de inmobilon-NC para Rab1a y Sec13 y en membrana de PVDF para Rab2. Las membranas se bloquearon por 1 h con 5% de leche descremada en PBS-0.1% Tween 20. Los anticuerpos primarios indicados se diluyeron en la solución leche descremada-PBS-Tween 20 y se dejaron sumergidas las membranas toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 min utilizando PBS-0.1% Tween 20. Los anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a peroxidasa se incubaron con las membranas por 1 h a temperatura ambiente. Tras tres últimos lavados la señal se detectó en películas Kodak medical X-ray films. Para la cuantificación por densitometría se utilizó el software ImageJ.

5.8 Ensayos de transporte

El plásmido pEGFP-VSVG se preparó para transfección utilizando el método descrito para las dominantes negativas. La mezcla final de lipofección se adicionó a monocapas de células 72 h después de haber sido transfectadas con los siRNAs según el método antes descrito. La incubación de 6 h con la mezcla de lipofección se realizó a 40°C y posteriormente se intercambió la

mezcla por MEM-RS y se continuó incubando a 40°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A las 24 hpt las células se incubaron a 32°C por 40 minutos. Las monocapas se trataron para analizarse por inmunofluorescencia sin adición de anticuerpos.

Por otro lado, el plásmido pEGFP-VSVG también se preparó para cotransfección con los plásmidos PCMV-intron myc Rab1aWT, PCMV-intron myc Rab1a S25N, PCMV-intron myc Rab2WT o PCMV-intron myc Rab2 S20N. La mezcla final de lipofección se adicionó a monocapas de células subconfluentes y se siguió el mismo procedimiento de incubación y cambio de temperatura que con el plásmido solo.

5.9 Colocalización de la proteína tsVSVG-GFP con marcadores celulares

Se realizaron los ensayos de transporte de la proteína tsVSVG-GFP (apartado 5.7) en células que expresan las mutantes dominantes negativas o su contraparte silvestre. Las monocapas se procesaron para analizarse por inmunofluorescencia en un microscopio de epifluorescencia, utilizando α -KDEL y α -GM138 como anticuerpos primarios. Se utilizaron anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a Alexa-568.

6.0 RESULTADOS

6.1 Efecto del silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 sobre la infectividad de la cepa bovina de rotavirus UK.

El tamizaje primario realizado en nuestro laboratorio sugirió que el silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 afectaba la infectividad de la cepa UK de RV, pero no mostraba efecto en las cepas nar3 y RRV (Silva-Ayala, datos no publicados). Para verificar el efecto del silenciamiento de estos genes sobre la infectividad de UK, se transfectaron en células MA104 los siRNA dirigidos a cada uno de los tres genes en cuestión, así como un siRNA irrelevante y el siRNA dirigido a la subunidad 6 de la ATPasa vacuolar (ATPv6) como control positivo. Las monocapas se infectaron con la cepa UK a una MOI de 3 y se procesaron 6 hpt para ser analizadas por inmunofluorescencia. Se cuantificó la infectividad relativa en las células silenciadas en comparación con las células control y se analizaron los datos de tres experimentos independientes. En los ensayos de infectividad también se comprobó la infectividad en células sometidas al proceso de transfección reversa pero sin siRNA (Nsi). La eficiencia de los silenciamientos se comprobó mediante WB.

En comparación con células transfectadas con el siRNA irrelevante, las células tratadas con el siRNA dirigido contra la GTPasa Rab1a mostraron una disminución de hasta el 68% de dicha proteína (Figura 7b). En estas células silenciadas, la infectividad de UK disminuyó hasta un 40% (Figura 7a) en comparación con el control irrelevante lo que hasta el momento sugería que alguna función de Rab1a era aparentemente requerida durante el ciclo infeccioso de UK. El silenciamiento de la ATPv6 disminuyó hasta un 60% la infectividad de UK lo cual se asemeja a la disminución de la infectividad reportada de entre el 70 al 80% para otras cepas de rotavirus (Silva-Ayala *et al.*, 2013), esto otorga solidez al ensayo de silenciamiento e infectividad. No se observó diferencia significativa de la infectividad de UK entre células Nsi y el control irrelevante lo cual asegura que el siRNA-irre utilizado no modifica por sí mismo la infectividad y por tanto resulta un buen control.

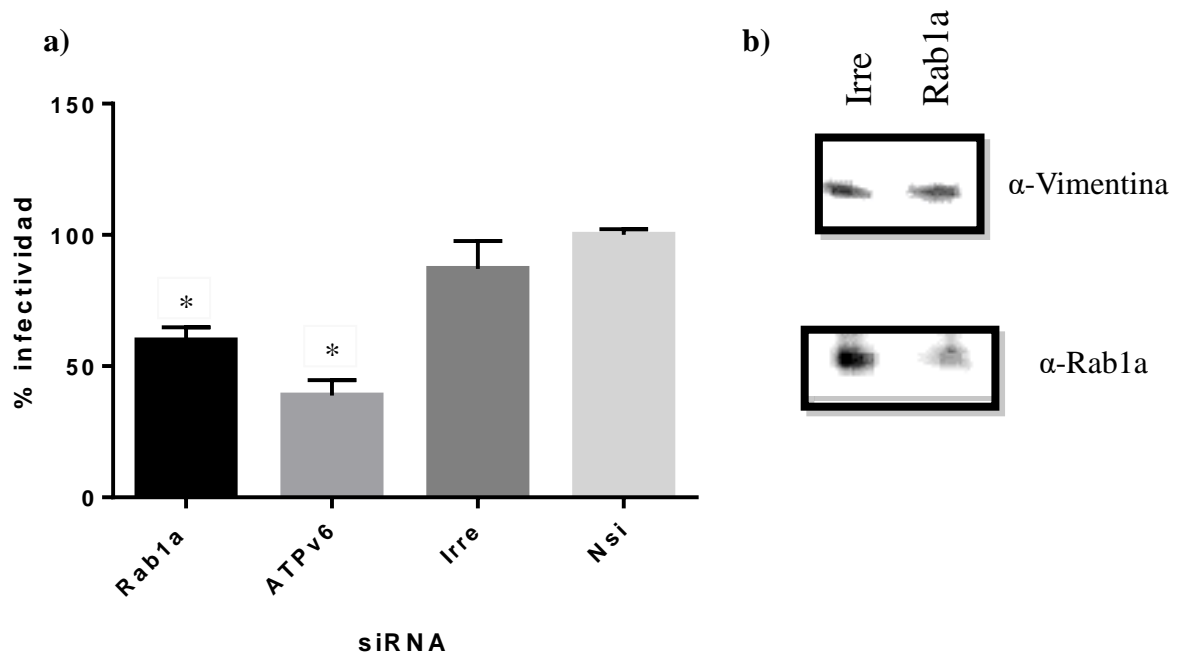


Figura 7.- Efecto del silenciamiento de Rab1a sobre la infectividad de la cepa de rotavirus UK. Se transfectaron células MA104 con los siRNA correspondientes y 72 hpt fueron infectadas con la cepa bovina de rotavirus UK (MOI=3). A las 6 h post-infección se procesaron para inmunofluorescencia y se determinó el número de células infectadas. a) Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad relacionada a la infectividad obtenida en el control no silenciado (Nsi) sometido al proceso de transfección reversa. Como control positivo se realizaron ensayos de infectividad en células silenciadas en la subunidad 6 de la ATPasa vacuolar (ATPv6). Se muestra el error estándar de la media aritmética de tres ensayos independientes realizados por duplicado *P<0.01. b). Se analizaron en GraphPad Prism con una prueba de Tukey. La eficiencia del silenciamiento se comprobó por Western blot. Se muestran inmunoblots representativos de la detección de Rab1a en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irre) o con el siRNA dirigido contra Rab1a (Rab1a). La detección de vimentina se utilizó como control de carga.

La transfección del siRNA dirigido contra el gen de la GTPasa Rab2 provocó una disminución de hasta el 95% de la proteína en comparación con el tratamiento irrelevante (Figura 8b). Sin embargo, la infectividad de la cepa UK en estas células silenciadas no mostró ningún cambio significativo (Figura 8a). El silenciamiento de la ATPv6 provocó la disminución esperada en la infectividad de UK lo cual valida el ensayo de silenciamiento y de infectividad. Estos resultados parecen demostrar de inicio que ninguna de las funciones de

Rab2 se requiere durante el ciclo de infección de la cepa UK o que alguna otra proteína celular puede compensar su ausencia al efectuar al menos de manera parcial su función.

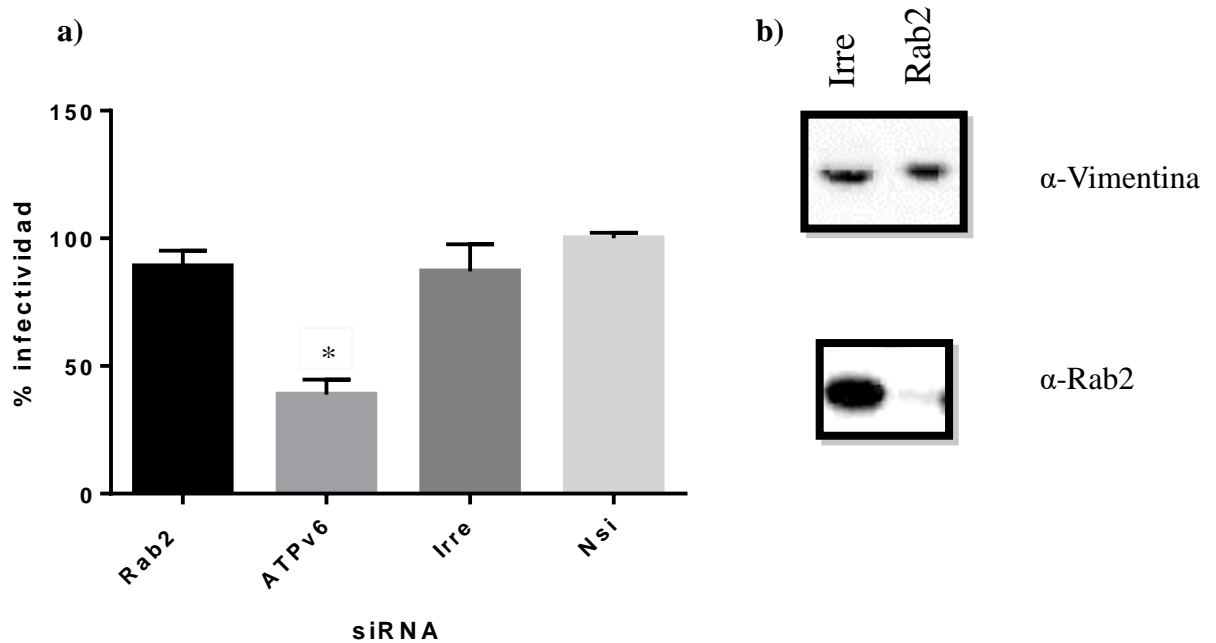


Figura 8.- Efecto del silenciamiento de Rab2 en la infectividad de la cepa de rotavirus UK. Se transfectaron células MA104 con los siRNA correspondientes y 72 hpt fueron infectadas con la cepa bovina de rotavirus UK (MOI=3). A las 6 h post-infección se procesaron para inmunofluorescencia y se determinó el número de células infectadas. a) Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad relacionada a la infectividad obtenida en el control no silenciado (Nsi) pero sometido al proceso de transfección reversa. Como control positivo se realizaron ensayos de infectividad en células silenciadas en la subunidad 6 de la ATPasa vacuolar (ATPv6). Se muestra el error estándar de la media aritmética de tres ensayos independientes realizados por duplicado *P<0.01. Se analizaron en GraphPad Prism con una prueba de Tukey. b) La eficiencia del silenciamiento se comprobó por Western blot. Se muestran inmunoblots representativos de la detección de Rab2 en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irre) o con el siRNA dirigido contra Rab2 (Rab2). La detección de vimentina se utilizó como control de carga.

La cuantificación de la proteína Sec13 en las células transfectadas con el siRNA irrelevante y el siRNA dirigido contra Sec13 mostró una disminución de

hasta el 78% de dicha proteína (Figura 9b). El silenciamiento de Sec13 tampoco provocó cambios en la infectividad de la cepa UK (Figura 9a).

Los resultados de silenciamiento en conjunto sugieren que, si bien el silenciamiento de Rab1a provoca una disminución de la infectividad de UK, la ausencia de cambio en la infectividad al silenciar Rab2 y Sec13 indicaría que la función de Rab1a requerida es independiente del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi.

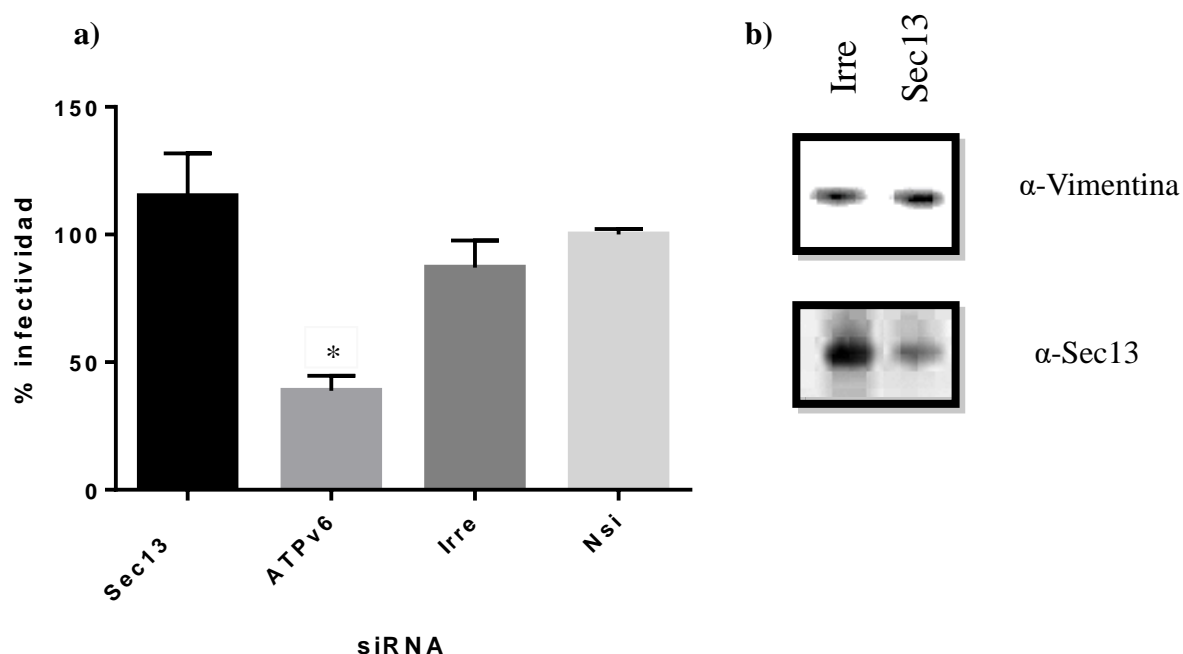


Figura 9.- Efecto del silenciamiento de Sec13 en la infectividad de la cepa de rotavirus UK. Se transfectaron células MA104 con los siRNA correspondientes y 72 hpt fueron infectadas con la cepa bovina de rotavirus UK (MOI=3). A las 6 h post-infección se procesaron para inmunofluorescencia y se determinó el número de células infectadas. a) Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad relacionada a la infectividad obtenida en el control no silenciado (Nsi) pero sometido al proceso de transfección reversa. Como control positivo se realizaron ensayos de infectividad en células silenciadas en la subunidad 6 de la ATPasa vacuolar (ATPv6). Se muestra el error estándar de la media aritmética de tres ensayos independientes realizados por duplicado *P<0.01. Se analizaron en GraphPad Prism con una prueba de Tukey. b) La eficiencia del silenciamiento se comprobó por Western blot. Se muestran inmunoblots representativos de la detección de Rab2 en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irre) o con el siRNA dirigido contra Rab2 (Rab2). La detección de vimentina se utilizó como control de carga.

6.2 Ensayo de mutantes dominantes negativas

Las proteínas mutantes Rab1a S25N (Rab1aDN) y Rab2 S20N (Rab2DN) presentan una sustitución en el dominio involucrado en la unión de fosfato y la coordinación de Mg^{2+} ; esta mutación provoca menor afinidad por el GTP y restringe a Rab1aDN y a Rab2DN a una conformación inactiva unida a GDP. Cuando se expresan en células transformadas, estas proteínas mutantes inhiben a sus contrapartes silvestres (Rab1aWT o Rab2WT) por competencia de reguladores y efectores endógenos (Nuoffer *et al.*, 1994; Tisdale *et al.*, 1992).

Como estrategia alternativa para evaluar el papel de Rab1a y de Rab2 sobre la infectividad de la cepa UK se transfectaron plásmidos que codifican para la versión mutante DN (PCMV-intron myc Rab1a S25N y PCMV-intron myc Rab2 S20N) o para su contraparte silvestre. Las monocapas transfectadas se infectaron con la cepa UK (MOI=3) y 6 hpi se procesaron por inmunofluorescencia. Se calculó la infectividad relativa contando por cada réplica 200 células que expresaran la proteína heteróloga (detectadas por el tag c-myc) y se determinó el porcentaje de infección en células que expresaban la DN en comparación con células que expresaron la versión silvestre heteróloga.

La expresión de Rab1aDN no provocó disminución en la infectividad de la cepa UK comparada con células expresando la proteína Rab1aWT. Por otro lado, la expresión de Rab2DN provocó una disminución de hasta el 50% en la infectividad de la cepa UK (Figura 10).

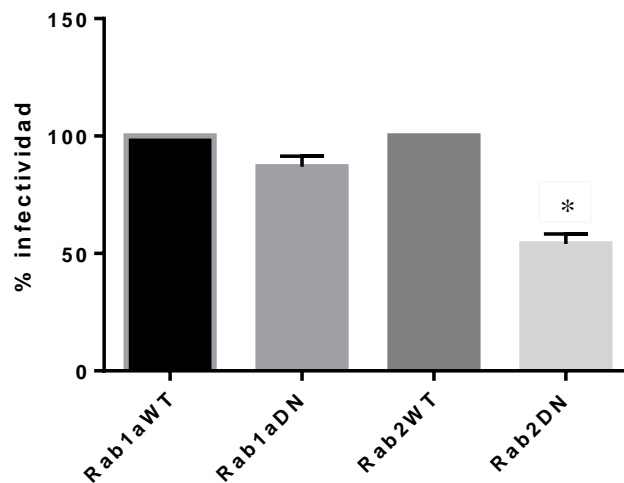


Figura 10.- Expresión de mutantes dominantes negativas de Rab1a y Rab2 y su efecto sobre la infectividad de la cepa UK. Los plásmidos que codifican para las mutantes dominantes negativas y las proteínas silvestres de Rab1a y Rab2 fueron lipofectados mediante transfección reversa en células MA104. A las 24 hpt las células se infectaron con la cepa UK (MOI=3) y 6 hpt se procesaron por inmunofluorescencia. Se muestra el porcentaje de infectividad de la cepa UK en células expresando las mutantes dominantes negativas de Rab1a (Rab1aDN) y de Rab2 (Rab2DN). Se tomó como 100% la infectividad en células MA104 transfectadas con construcciones que expresan las proteínas silvestres de Rab1a (Rab1aWT) y de Rab2 (Rab2WT). Se muestra el error estándar de la media aritmética de tres ensayos independientes realizados por duplicado *P<0.01. Se analizaron en GraphPad Prism con una prueba de Tukey.

6.3 Ensayos de transporte de la proteína termosensible VSVG-GFP

La proteína termosensible VSVG-GFP (tsVSVG-GFP) se utilizó para realizar ensayos de transporte los cuales permitieron evaluar si el silenciamiento de las proteínas de interés así como la expresión de las mutantes dominantes negativas de éstas inhiben de manera eficiente el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi en células MA104.

Se ha reportado que si las células que expresan la tsVSVG-GFP se incuban a 40°C (temperatura restrictiva), la tsVSVG-GFP se pliega erróneamente de manera que no se transporta hacia el aparato de Golgi y se acumula en el lumen del RE; en cambio, cuando las células se incuban a 32°C (temperatura permisiva) la proteína se pliega correctamente y se transporta al aparato de Golgi (Presley *et al.*, 1997).

Para evaluar si el transporte de la tsVSVG-GFP en nuestras células de trabajo es igual de eficiente a lo reportado en otras líneas celulares, se transfectaron

células MA104 con el plásmido pEGFP-VSVG y se incubaron a 40°C. A las 24 hpt unas células se mantuvieron en la temperatura restrictiva y se fijaron para IF mientras que otras se incubaron a la temperatura permisiva (32°C) por 40 min antes de fijarse. Una tercera monocapa de células transfectadas se incubó a 37°C durante 24 h y se procesó por IF a la par de las anteriores.

En las células MA104 transfectadas e incubadas a 37°C (Figura 11c) se observó a la proteína tsVSVG-GFP distribuida de manera heterogénea en toda la célula incluyendo la membrana plasmática (Figura 11c), lo que implica que a esta temperatura la proteína, o al menos parte de ella, se pliega correctamente y es eficientemente transportada a través de la vía secretora en células MA104. En las células incubadas a 40°C la proteína tsVSVG-GFP se observó localizada en una estructura reticular que abarca la mayoría de la superficie celular correspondiente aparentemente al RE (Figura 11a); por otro lado, el cambio a la temperatura permisiva por 40 min redistribuyó a la proteína tsVSVG-GFP hacia una localización perinuclear que correspondería al aparato de Golgi (Figura 11b). Esta distribución de la proteína tsVSVG-GFP es consistente con el fenotipo de transporte reportado en otras líneas celulares.

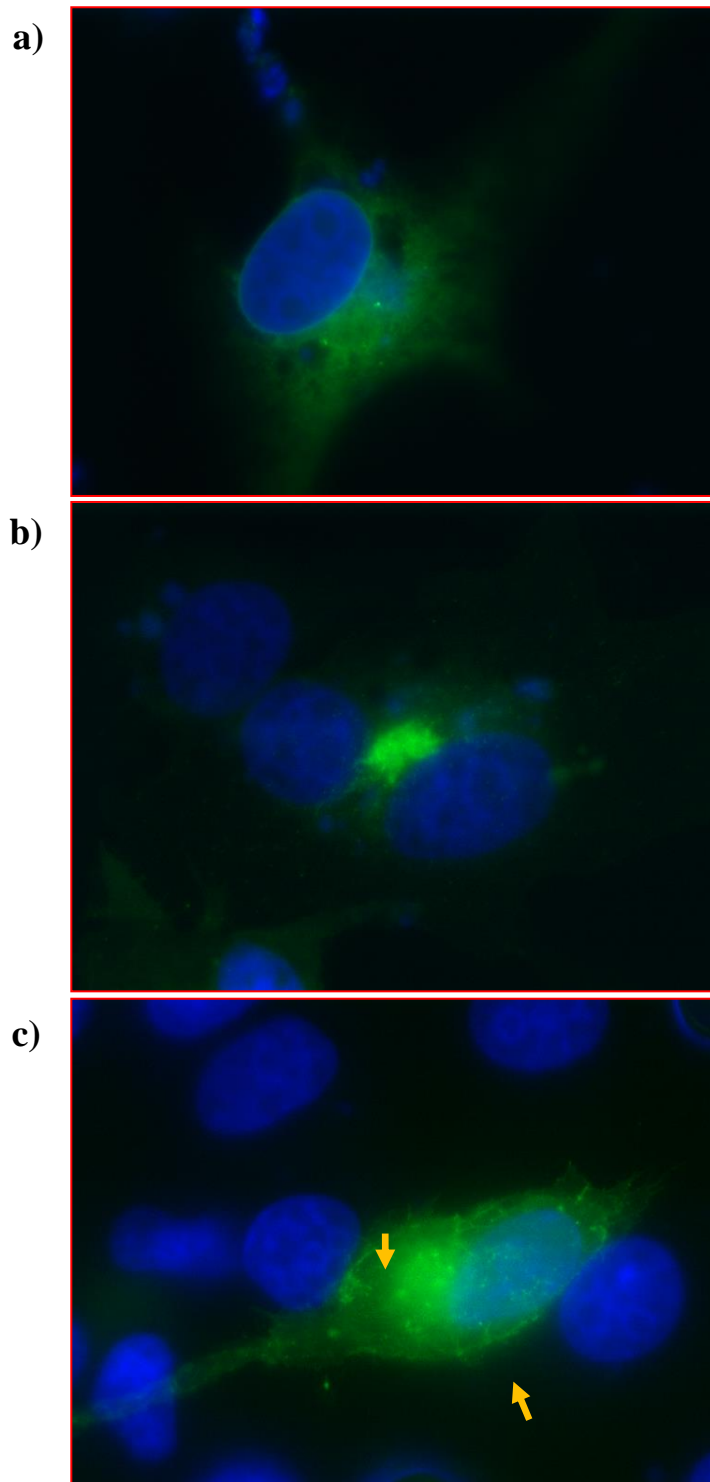


Figura 11.- Transporte de la proteína termosensible VSVG-GFP (tsVSVG-GFP) en células MA104. Las células MA104 se transfectaron con el plásmido pEGFP-VSVG y se incubaron a 40°C. A las 24 hpt unas células se mantuvieron en la temperatura restrictiva y se fijaron (a) mientras que otras se transfirieron a la temperatura permisiva (32°C) por 40 minutos (b) ambos tratamientos se procesaron para analizarse por inmunofluorescencia. Una tercer monocapa de células transfectadas se incubó a 37°C durante las 24 h, al igual que los dos tratamientos anteriores se procesó para inmunofluorescencia, las flechas amarillas señalan la proteína transportada a la membrana (c). Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Las células silenciadas en Rab1a, Rab2, Sec13 y el control irrelevante se transfectaron con el plásmido pEGFP-VSVG y se incubaron a 40°C. Las monocapas se transfirieron 24 hpt a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF. El silenciamiento de la expresión de los genes que codifican para las proteínas Rab1a, Rab2 y Sec13 provocó un cambio en el fenotipo de distribución de la tsVSVG-GFP (Figura 12). En contraste con el fenotipo observado en el control irrelevante, donde la proteína tsVSVG-GFP se observa concentrada en una ubicación perinuclear correspondiente al aparato de Golgi, en las células silenciadas la proteína tsVSVG-GFP se observa distribuida en la célula a modo de un puntilleo fino.

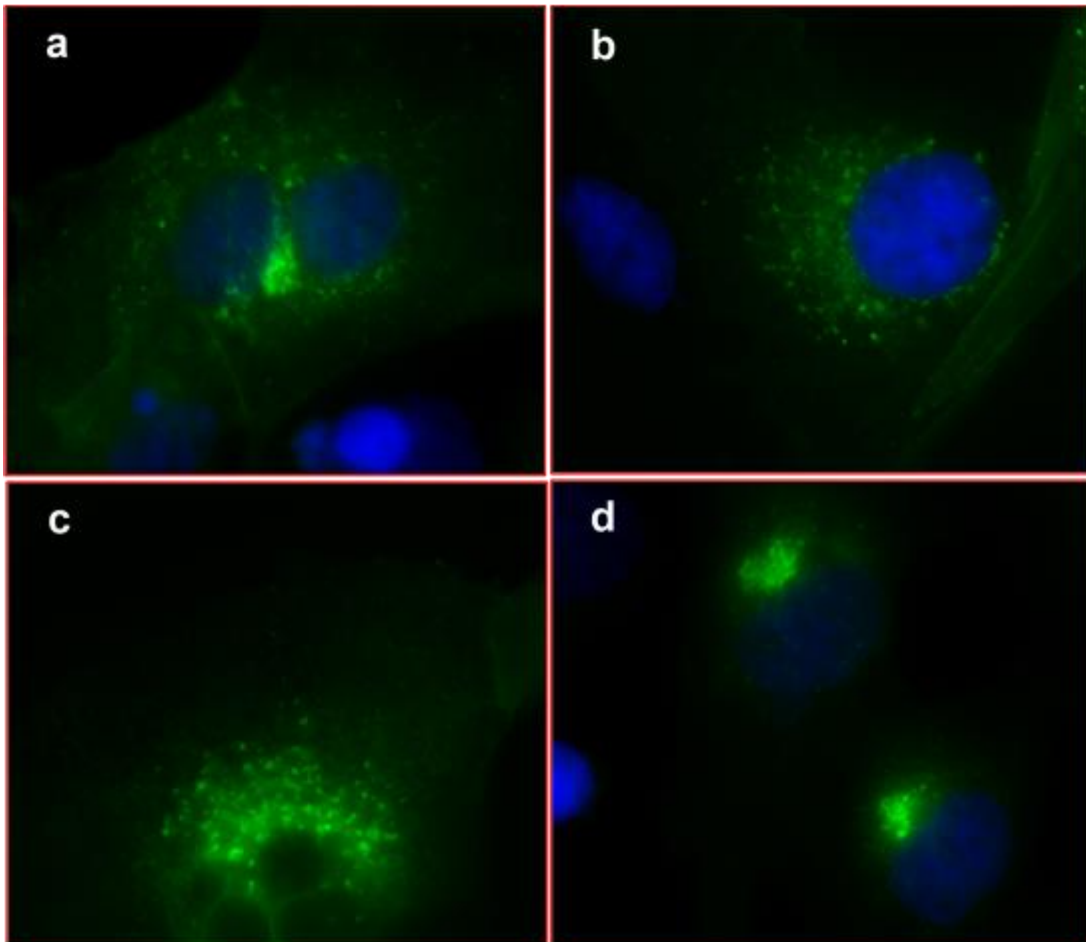


Figura 12.- Efecto del silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 sobre la distribución de la proteína termosensible VSVG-GFP. Las células MA104 se transfectaron con los siRNA dirigidos a los genes Rab1a (a), Rab2 (b) o Sec13 (c) y se utilizó siRNA "non-targeting" como un control irrelevante (d). Las monocapas se transfectaron 72 horas después con el plásmido pEGFP-VSVG y se incubaron a 40°C. A las 24 h las monocapas se transfirieron a 32°C por 40 min y se

fijaron para procesarse por IF. Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Por otro lado, el plásmido pEGFP-VSVG se co-transfectó con los plásmidos que codifican para la versión silvestre o para la versión DN de Rab1a o Rab2. Las células se incubaron a 40°C por 24 h, después se transfirieron a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF. Acorde con lo observado en células silenciadas, en aquellas células transfectadas con las DN se observó a la proteína tsVSVG-GFP distribuida como un puntilleo fino mientras que las células expresando las versiones silvestres (WT) mostraron a la tsVSVG-GFP en una ubicación perinuclear (Figura 13).

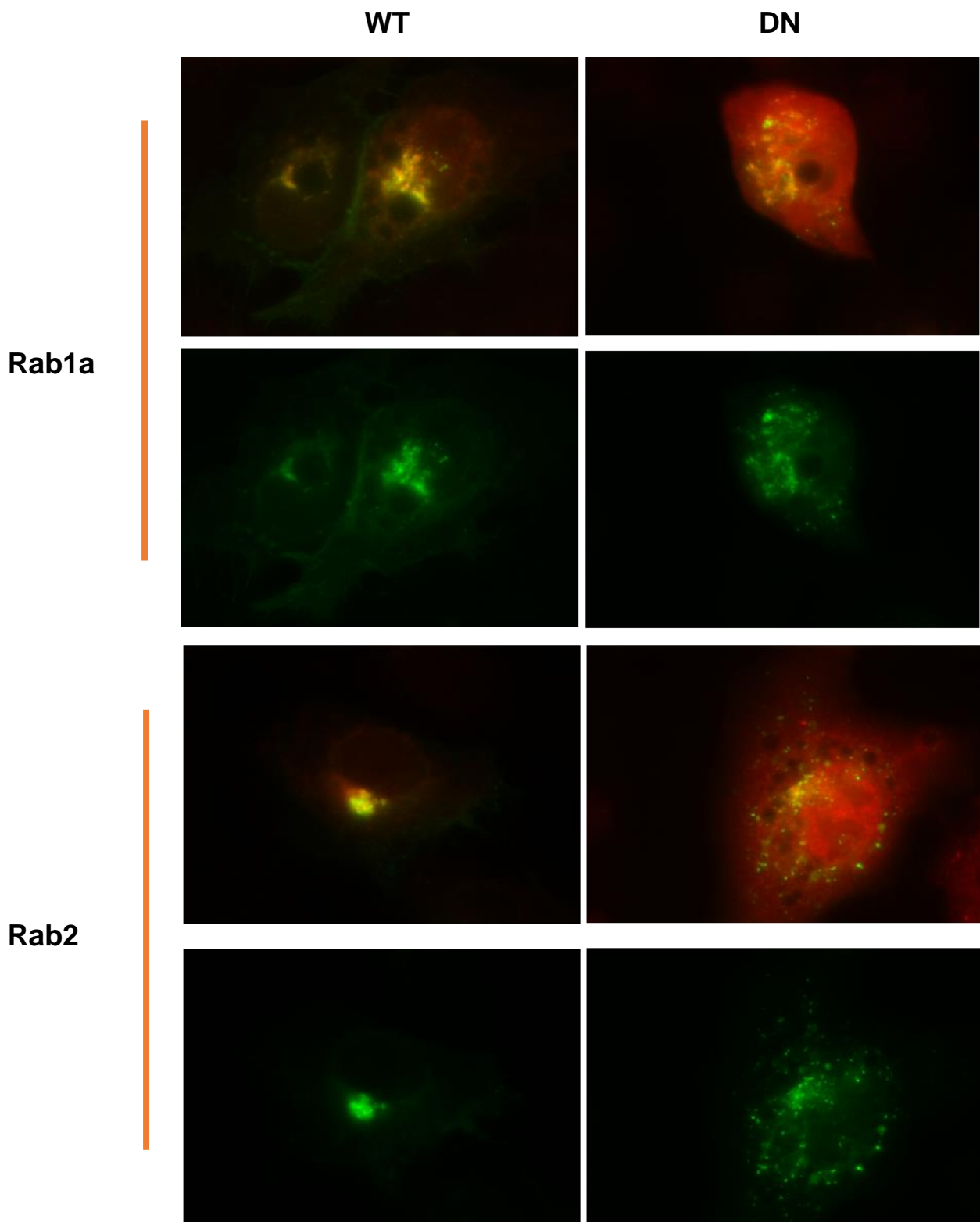


Figura 13.- Efecto de la expresión de mutantes dominantes negativas de Rab1a y Rab2 sobre la distribución de la proteína tsVSVG-GFP en células MA104. El plásmido pEGFP-VSVG se co-transfectó con plásmidos que codifican para la versión silvestre (WT) o para la versión mutante dominante negativa (DN) de Rab1a o Rab2. Las células se incubaron a 40°C por 24 h, después se transfirieron a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF. Nótese en verde la distribución de la proteína tsVSVG-GFP; en rojo se observa el tag epítipo c-myc que

poseen las proteínas heterólogas tanto WT (panel izquierdo) como DN (panel derecho). Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

6.4 Determinación de la localización intracelular de la proteína tsVSVG-GFP

Para determinar la localización celular de la proteína tsVSVG-GFP en los fenotipos observados al expresar las mutantes dominantes negativas, se realizaron ensayos de transporte y se utilizaron marcadores celulares de RE (α -KDEL) y del aparato de Golgi (α -GM130). Se co-expresó la proteína tsVSVG-GFP con las versiones DN o silvestres de Rab1a o Rab2 en células MA104 incubadas a 42° C; 48 hpt las monocapas se transfirieron a 32° C por 40 min y se procesaron para inmunofluorescencia. Como se observa en las Figuras 14 y 15, al expresar a las proteínas silvestres de Rab1a y Rab2 la señal perinuclear de la proteína tsVSVG-GFP no co-localiza con la de KDEL. Cuando se expresan las mutantes dominantes negativas la proteína tsVSVG-GFP distribuida como un puntilleo tampoco co-localiza con el marcador de RE. Lo anterior nos indica que a la temperatura permisiva la tsVSVG-GFP fue transportada fuera de RE tanto al expresar las Rab1aWT y la Rab2WT como al expresar la Rab1aDN y la Rab2DN.

Por otro lado, utilizando el anticuerpo α -GM130 como marcador del aparato de Golgi, se observó (Figuras 16 y 17) que al expresar las proteínas silvestres de Rab1a y Rab2 existe una co-localización perfecta entre la proteína tsVSVG-GFP y el aparato de Golgi ubicado de forma perinuclear. Al expresar las mutantes dominantes negativas de Rab1a y Rab2, la proteína tsVSVG-GFP también co-localiza con la señal de GM130. Sin embargo, la distribución del aparato de Golgi corresponde al fenotipo punteado y disperso antes mencionado en contraste con la ubicación perinuclear propia de las proteínas silvestres.

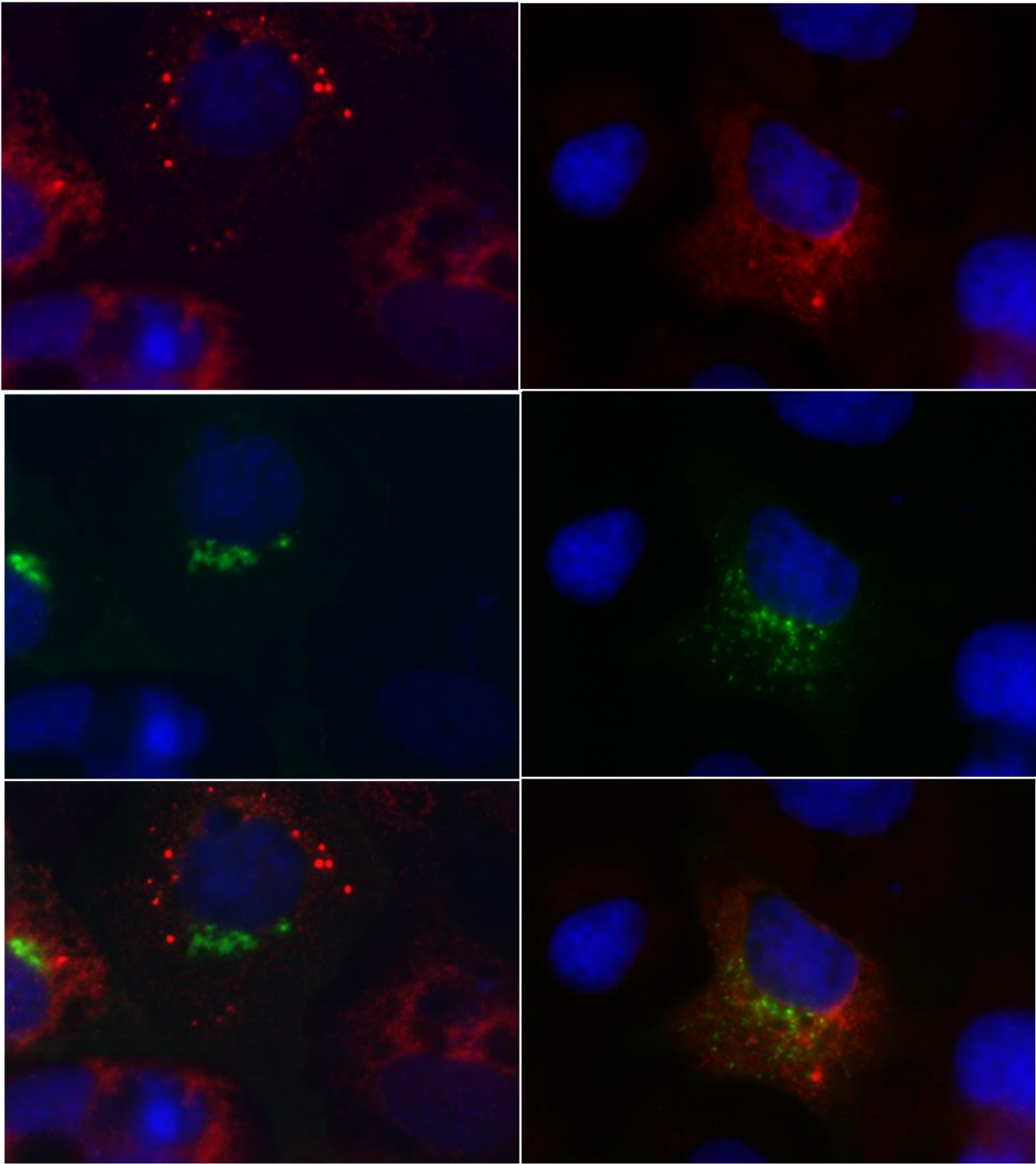


Figura 14.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab1a no co-localiza con KDEL. El plásmido pEGFP-VSVG se co-transfectó con plásmidos que codifican para la versión silvestre (WT) o para la versión mutante dominante negativa (DN) de Rab1a. Las células se incubaron a 40°C por 24 h, después se transfirieron a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF utilizando el anticuerpo α -KDEL para marcar retículo endoplásmico. En la columna izquierda se muestra el fenotipo observado en células expresando Rab1aWT mientras que en la columna derecha se observa el fenotipo obtenido en células expresando Rab1aDN. En rojo se muestra la señal de KDEL (panel superior) mientras que en verde se observa a la proteína tsVSVG-GFP (panel central), en el panel inferior se muestra la sobreposición de ambos canales. Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

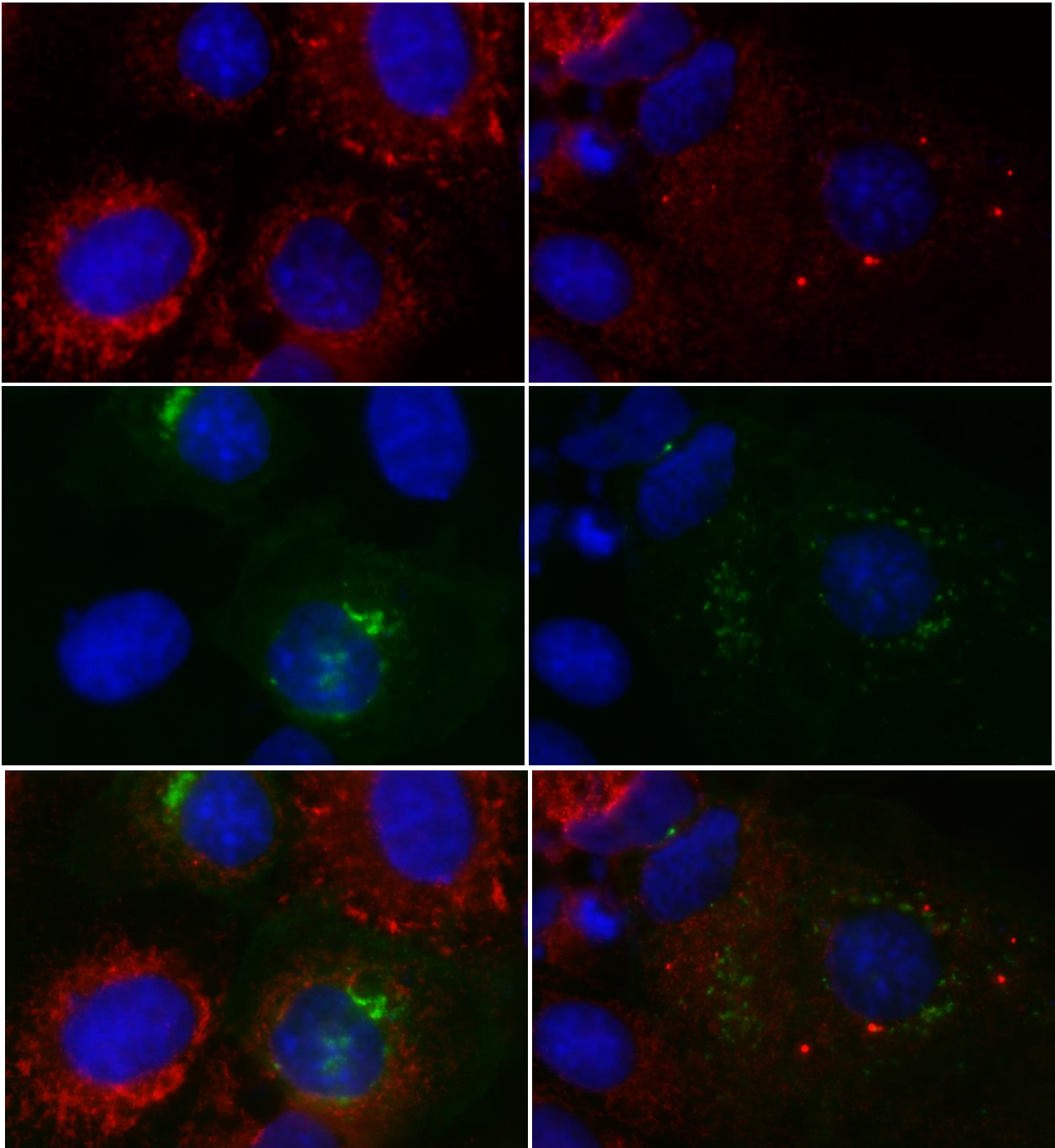


Figura 15.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab2 no co-localiza con KDEL. El plásmido pEGFP-VSVG se co-transfectó con plásmidos que codifican para la versión silvestre (WT) o para la versión mutante dominante negativa (DN) de Rab2. Las células se incubaron a 40°C por 24 h, después se transfirieron a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF utilizando el anticuerpo α -KDEL para marcar retículo endoplásmico. En la columna izquierda se muestra el fenotipo observado en células expresando Rab2WT mientras que en la columna derecha se observa el fenotipo obtenido en células expresando Rab2DN. En rojo se muestra la señal de KDEL (panel superior) mientras que en verde se observa a la proteína tsVSVG-GFP (panel central), en el panel inferior se muestra la sobre posición de ambos canales. Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

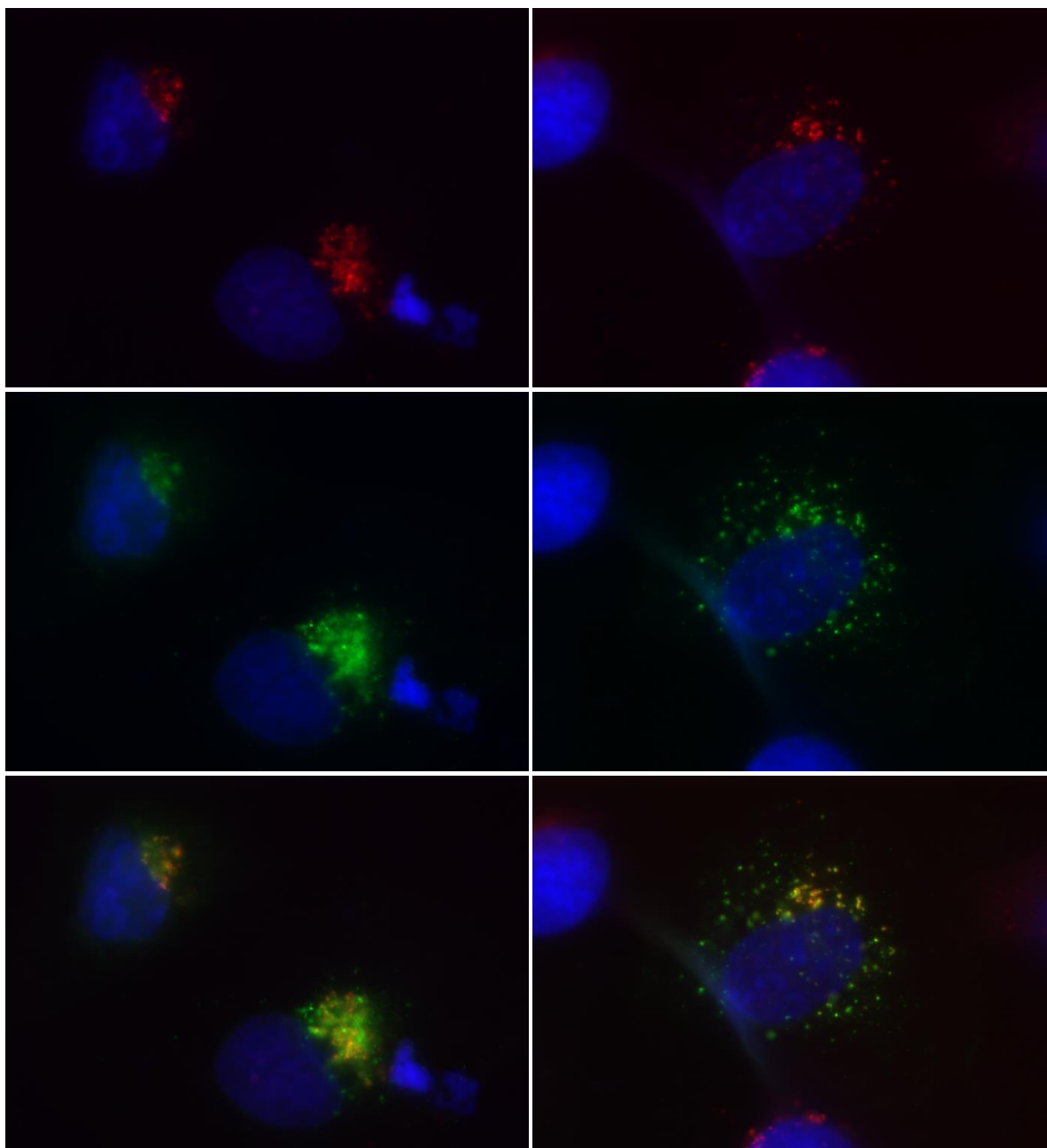


Figura 16.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab1a co-localiza con GM130. El plásmido pEGFP-VSVG se co-transfectó con plásmidos que codifican para la versión silvestre (WT) o para la versión mutante dominante negativa (DN) de Rab1a. Las células se incubaron a 40°C por 24 h, después se transfirieron a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF utilizando el anticuerpo α -GM130 para marcar aparato de Golgi. En la columna izquierda se muestra el fenotipo observado en células expresando Rab1aWT mientras que en la columna derecha se observa el fenotipo obtenido en células expresando Rab1aDN. En rojo se muestra la señal de GM130 (panel superior) mientras que en verde se observa a la proteína tsVSVG-GFP (panel central), en el panel inferior se muestra la sobreposición de ambos canales. Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

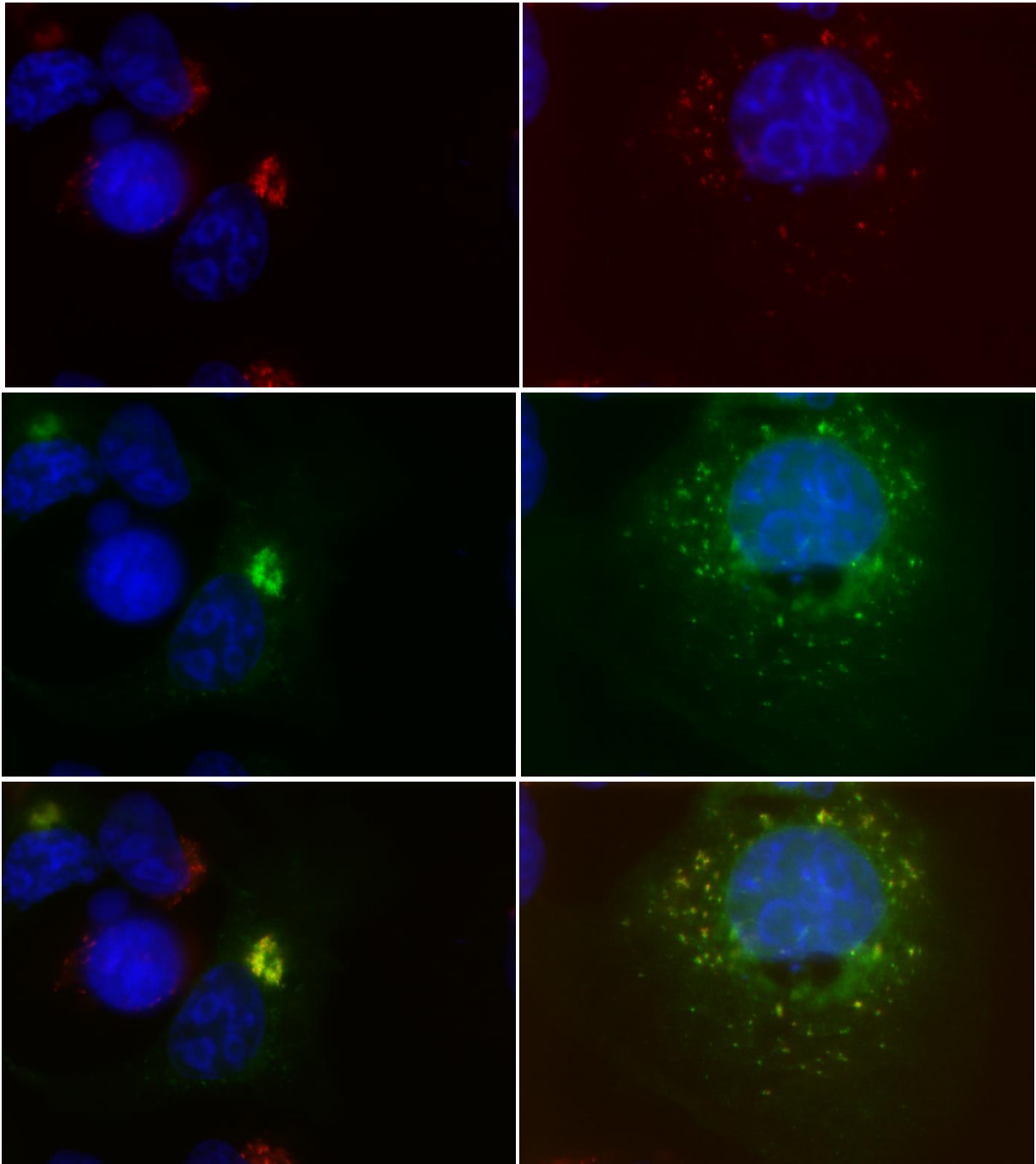


Figura 17.- La proteína tsVSVG-GFP en células expresando la forma silvestre y mutante dominante negativa de Rab2 co-localiza con GM130. El plásmido pEGFP-VSVG se co-transfectó con plásmidos que codifican para la versión silvestre (WT) o para la versión mutante dominante negativa (DN) de Rab2. Las células se incubaron a 40°C por 24 h, después se transfirieron a 32°C por 40 min y se fijaron para procesarse por IF utilizando el anticuerpo α -GM130 para marcar aparato de Golgi. En la columna izquierda se muestra el fenotipo observado en células expresando Rab2WT mientras que en la columna derecha se observa el fenotipo obtenido en células expresando Rab2DN. En rojo se muestra la señal de GM130 (panel superior) mientras que en verde se observa a la proteína tsVSVG-GFP (panel central), en el panel inferior se muestra la sobreposición de ambos canales. Imágenes representativas del fenotipo principal en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

7.0 DISCUSIÓN

Un tamizaje primario realizado en nuestro laboratorio sugirió que el silenciamiento de Rab1a, Rab2 y Sec13 afectaba la infectividad de la cepa UK, pero no mostraba efecto en las cepas nar3 y RRV (Silva-Ayala, datos no publicados). Para verificar el efecto del silenciamiento de estos tres genes sobre la infectividad de UK se silenciaron Rab1a, Rab2 y Sec13 utilizando un método de transfección reversa de los siRNA correspondientes. Las células silenciadas se infectaron con la cepa bovina de RV UK y se compararon con un control transfectado con un siRNA irrelevante. Además, como estrategia alternativa para evaluar el efecto sobre la infectividad de la cepa UK, se expresaron mutantes dominantes negativas (DN) de Rab1a (Rab1a S25N) y Rab2 (Rab2 S20N). Estas DN presentan sustituciones en el dominio de unión a GTP lo que genera proteínas que actúan como potentes inhibidores del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi (Tisdale *et al.*, 1992).

Las células transfectadas con el siRNA dirigido contra la GTPasa Rab1a mostraron una disminución de hasta el 68% de dicha proteína en comparación con células transfectadas con el siRNA irrelevante. La infectividad de la cepa bovina UK en estas células silenciadas disminuyó hasta un 40% mientras que la expresión de la proteína Rab1aDN no provocó cambio en la infectividad de la cepa UK. Se ha reportado discrepancia entre los resultados obtenidos utilizando siRNA o inhibición de la función por perturbación de la interacción proteína-proteína. Las proteínas que se han tratado con moléculas inhibitoras y que han perdido su actividad catalítica pueden aún funcionar como eslabones estructurales en interacciones proteína-proteína que son biológicamente importantes, mientras que el silenciamiento de estas mismas proteínas mediante siRNA provoca la inhibición catalítica y la disrupción de las interacciones proteína-proteína (Weiss *et al.*, 2007). De acuerdo a esto, el silenciamiento de la GTPasa Rab1a podría provocar una menor disponibilidad de la proteína por lo que se ven disminuidas tanto las funciones que dependen de actividad catalítica como las interacciones proteína-proteína que esta normalmente efectúa justificando que la infectividad de RV UK se vea disminuida si al menos alguna de estas funciones se requiere durante el ciclo

infeccioso. Por otro lado, la proteína Rab1aDN inhibe la actividad catalítica de su contraparte silvestre (Rab1aWT) por competencia de reguladores y efectores endógenos; sin embargo, Rab1aDN aun efectúa algunas de las interacciones proteína-proteína propias de la versión silvestre (Tisdale *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1994). La disminución de la infectividad en células silenciadas sugiere que al menos alguna función de Rab1a es aparentemente requerida durante el ciclo infeccioso de UK y a pesar de que la disminución es menor al 50%, después del silenciamiento aún está presente un 32% de proteína Rab1a y desconocemos si las cantidades residuales de proteína podrían ser suficientes para llevar a cabo al menos de manera parcial las funciones de Rab1a por lo que el efecto sobre la infectividad no es tan dramático. La falta de efecto sobre la infectividad de RV UK al expresar Rab1aDN sugiere que la función de Rab1a que se requiere durante el ciclo infeccioso de RV UK, no es la actividad catalítica GTPasa de Rab1a, sino que probablemente esté asociada a las interacciones proteína-proteína de Rab1a.

Dentro de la familia de las Rab GTPasas es común la expresión de isoformas altamente conservadas que presentan redundancia de función (Haubruck *et al.*, 1989; Barral *et al.*, 2002). La proteína Rab2b es una isoforma de Rab2 con la cual comparte el 82% de identidad (Ni *et al.*, 2002) y aunque la transfección del siRNA dirigido contra el gen de la GTPasa Rab2 provocó una disminución de hasta el 95% de la proteína en comparación con el tratamiento irrelevante la infectividad de la cepa UK en estas células silenciadas no mostró ningún cambio, mientras que la expresión de Rab2DN provocó una disminución de hasta el 50% en la infectividad de la cepa UK. Estos datos sugieren que a pesar de que alguna función de Rab2 es necesaria durante el ciclo replicativo de RV UK, durante su silenciamiento la isoforma Rab2b podría llevar a cabo las funciones de Rab2. Por otro lado, la expresión de la proteína Rab2DN inhibe a sus contraparte silvestre (Rab2WT) por competencia de reguladores y efectores endógenos por lo que también inhibiría por competencia de los mismos reguladores y efectores a la isoforma Rab2b (Tisdale *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 2008).

El silenciamiento de Sec13 fue del 78% y no se observó cambios en la infectividad de la cepa de RV UK, esto sugiere que probablemente ninguna función de Sec13 se requiere durante el ciclo infeccioso de RV.

La proteína termosensible VSVG-GFP (tsVSVG-GFP) se utilizó para evaluar si el silenciamiento de las proteínas de interés o la expresión de las DN de éstas, provoca la inhibición del transporte vesicular que ocurre entre el RE y el aparato de Golgi en nuestras células de trabajo, al igual que lo reportado en otras líneas celulares (Cox *et al.*, 1991; Tisdale *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2012). En este sistema, mientras las células se incuban a 40°C la tsVSVG-GFP se encuentra plegada de manera que no se puede transportar hacia el aparato de Golgi por lo que se acumula en el lumen del RE, cuando estas células se transfieren a 32°C la proteína se pliega correctamente y se transporta al aparato de Golgi (Presley *et al.*, 1997).

Inicialmente, se determinó que en células MA104 la proteína tsVSVG-GFP es eficientemente transportada a través de la vía secretora. En las células incubadas a 40°C la proteína tsVSVG-GFP se observó localizada en una estructura reticular que abarca la mayoría de la superficie celular correspondiente aparentemente al RE, mientras que en la temperatura permisiva la proteína tsVSVG-GFP se redistribuyó hacia una localización perinuclear que corresponde al aparato de Golgi e incluso se pudo observar en la membrana plasmática lo cual demuestra su transporte eficiente a través de la vía secretora en células MA104.

El silenciamiento de las proteínas Rab1a, Rab2 y Sec13, así como la expresión de Rab1aDN y Rab2DN, provocó un cambio en el fenotipo de distribución de la tsVSVG-GFP. En contraste con el fenotipo observado en el control irrelevante y en el control expresando las contrapartes silvestres, donde la proteína tsVSVG-GFP se observa concentrada en una ubicación perinuclear, en las células silenciadas la proteína tsVSVG-GFP se observa distribuida en la célula en estructuras puntiformes. Se ha demostrado previamente que la expresión de versiones mutantes de Rab1 y Rab2 en algunas líneas celulares provoca la inhibición del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi, el análisis por inmunofluorescencia en estas células mostró que aun a la temperatura

permissiva la proteína tsVSVG-GFP no es transportada eficientemente al aparato de Golgi y se localiza en estructuras punteadas distribuidas en el citoplasma (Cox *et al.*, 1991; Tisdale *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2012). La distribución de la tsVSVG-GFP en células MA104 silenciadas o que expresan las DN parecía consistente con las estructuras puntiformes reportadas cuando se inhibe el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi (Tisdale *et al.*, 1992). Sin embargo, era necesario determinar la localización celular de la tsVSVG-GFP, por lo cual se realizaron ensayos de transporte utilizando marcadores celulares de RE (α -KDEL) y del aparato de Golgi (α -GM130). Estos ensayos mostraron que cuando se expresan las proteínas silvestres de Rab1a y Rab2 en células MA104 la proteína tsVSVG-GFP es transportada eficientemente al aparato de Golgi en su ubicación perinuclear. Por otro lado, cuando se expresan las versiones DN aunque la proteína tsVSVG-GFP se encuentra distribuida como un puntillero, co-localiza con el marcador del aparato de Golgi. Esto nos indica que la inhibición de Rab1a, Rab2 o Sec13 en células MA104 no provoca la inhabilitación del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi a diferencia de lo reportado en otras células (Tisdale *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 2012) y que la distribución de la proteína tsVSVG-GFP en estructuras puntiformes es atribuida a la fragmentación del aparato de Golgi. Se ha observado ampliamente que la inhibición del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi, por tratamientos químicos (BFA, ácido okadaico) o la expresión de proteínas mutantes necesarias para el transporte, provoca la dispersión de las membranas de Golgi (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1990; Lucocq 1992; Martínez *et al.*, 1997; Storrie *et al.* 1998). También, mediante análisis por inmunofluorescencia o por determinación de resistencia/sensibilidad a Endo H se comprobó que existe inhibición del transporte anterógrado, de manera que las estructuras puntiformes donde se localiza la tsVSVG-GFP no corresponden a los fragmentos del aparato de Golgi (Tisdale *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1994), como es nuestro caso. Sin embargo, existen reportes de que la inhibición funcional de proteínas ampliamente demostradas como necesarias durante el transporte entre el RE y el aparato de Golgi no provoca la inhabilitación de dicho transporte y que la tsVSVG-GFP es eficientemente transportada a los fragmentos de Golgi que son completamente funcionales (Cutrona *et al.*, 2013). Estos datos en conjunto sostienen la idea de que una vía COPII-independiente

de reemplazo funciona alternativamente para el transporte de la tsVSVG-GFP en células MA104 que han sido silenciadas o que expresan DN de proteínas de los complejos COP.

Dado que el silenciamiento o la expresión de las DN no inhibe el transporte anterógrado en las células MA104, la disminución en la infectividad de la cepa bovina UK al silenciar Rab1a o expresar Rab2DN debe ser atribuida a que la función requerida de estas dos proteínas durante el ciclo replicativo de UK es independiente de su participación en el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi.

8.0 CONCLUSIONES

Rab1a y Rab2 se requieren durante el ciclo de replicación de la cepa bovina de rotavirus UK.

La inhibición de Rab1a, Rab2 y Sec13 en células MA104 no provoca la disrupción del transporte anterógrado pero sí provoca la desintegración del aparato de Golgi.

La función de Rab1a y de Rab2 que es necesaria durante el ciclo de replicación de rotavirus es independiente de sus funciones en el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi.

9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Intracellular vesicular traffic. En *Molecular biology of the cell*. 5th edition. Garland science, Taylor & Francis Group. 2002. Pag 749-809.
2. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. *COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum*. 1994. *Cell*. 77(6):895-907.
3. Barral DC, Ramalho JS, Anders R, Hume AN, Knapton HJ, Tolmachova T, Collinson LM, Goulding D, Authi KS, Seabra MC. *Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome*. 2002. *J Clin Invest*. 110(2):247-57.
4. Copic A, Latham CF, Horlbeck MA, D'Arcangelo JG, Miller EA. *ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p*. 2012. *Science*. 335(6074):1359-62.
5. Cutrona MB, Beznoussenko GV, Fusella A, Martella O, Moral P, Mironov AA. *Silencing of mammalian Sar1 isoforms reveals COPII-independent protein sorting and transport*. 2013. *Traffic*. 14(6):691-708.
6. Davis S, Ferro-Novick S. *Ypt1 and COPII vesicles act in autophagosome biogenesis and the early secretory pathway*. 2015. *Biochem Soc Trans*. 43(1):92-6.
7. Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF. *Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs*. 2002. *EMBO*. 3: 1175–1180.
8. Díaz-Salinas MA, Silva-Ayala D, López S, Arias CF. *Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell*. 2014. *J Virol*. 88(8):4389-402.
9. Dormitzer PR, Sun ZY, Blixt O, Paulson JC, Wagner G, Harrison SC. *Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core*. *J Virol*. 2002. 76(20):10512-10517.
10. Estes MK, Kapikian AZ. En: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley PM, editors. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins. 2013. pp. 1348–1360.
11. Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, Deal EM, Greenberg HB. *Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblast*. 2009. *J Virol*. 83(14):6987-6994.
12. Fukuda M, Kanno E, Ishibashi K, Itoh T. *Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity*. 2008. *Mol Cell Proteomics*. 7(6):1031-42.
13. Gomez-Navarro N, Miller EA. *COP-coated vesicles*. 2016. *Curr Biol*. 26(2):R54-7.
14. Gomez-Navarro N, Miller EA. *Protein sorting at the ER-Golgi interface*. 2016. *J Cell Biol*. 215(6):769-778.
15. Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, López S. *Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis*. 2010. *J Virol*. 84(18):9161-9.
16. Haubruck H, Prange R, Vorgias C, Gallwitz D. *The ras-related mouse ypt1 protein can functionally replace the YPT1 gene product in yeast*. 1989. *EMBO J*. 8(5):1427-32.
17. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. 2004. *Virus Res*. 101(1):67-81.

18. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. *Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles*. 1997. *Nat. Struct. Biol.* 4(2):118–121.
19. Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP. *Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway*. 1990. *Cell.* 60(5):821-36.
20. López S, Arias CF. *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. 2004. *Trends Microbiol.* 12(6):271-8.
21. Lucocq J. *Mimicking mitotic Golgi disassembly using okadaic acid*. 1992. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 4):875-80.
22. Martinez O, Antony C, Pehau-Arnaudet G, Berger EG, Salaméro J, Goud B. *GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum*. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(5):1828-33.
23. Moyer BD, Allan BB, Balch WE. *Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering*. 2001. *Traffic.* 2(4):268-76.
24. Ni X, Ma Y, Cheng H, Jiang M, Guo L, Ji C, Gu S, Cao Y, Xie Y, Mao Y. *Molecular cloning and characterization of a novel human Rab (Rab2B) gene*. 2002. *J Hum Genet.* 47(10):548-51.
25. Nuoffer C, Davidson HW, Matteson J, Meinkoth J, Balch WE. *A GDP-bound form of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments*. 1994. *J Cell Biol.* 125(2):225-37.
26. Pando V, Isa P, Arias CF, López S. *Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection*. 2002. *Virology.* 1(30):190-200.
27. Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J. *ER-to-Golgi transport visualized in living cells*. 1997. *Nature.* 389(6646):81-5.
28. Sánchez-San Martín C, López T, Arias CF, López S. *Characterization of rotavirus cell entry*. 2004. *J Virol.* 78(5):2310-8.
29. Sánchez-Urbe E, Esparza-Aguilar M, Parashar UD, Richardson V. *Sustained Reduction of Childhood Diarrhea-Related Mortality and Hospitalizations in Mexico After Rotavirus Vaccine Universalization*. 2016. *Clin Infect Dis.* 62(2):S133-9.
30. Silva-Ayala D, López T, Gutiérrez M, Perrimon N, López S, Arias CF. *Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry*. 2013. *Proc Natl Acad Sci.* 110(25):10270-5.
31. Simpson JC, Joggerst B, Laketa V, Verissimo F, Cetin C, Erfle H, Bexiga MG, Singan VR, Hériché JK, Neumann B, Mateos A, Blake J, Bechtel S, Benes V, Wiemann S, Ellenberg J, Pepperkok R. *Genome-wide RNAi screening identifies human proteins with a regulatory function in the early secretory pathway*. 2012. *Nat Cell Biol.* 14(7):764-74.
32. Stenmark H. *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. 2009. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(8):513-25.
33. Storrie B, White J, Röttger S, Stelzer EHK, Saganuma T, Nilsson T. *Recycling of Golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering*. 1998. *J. Cell Biol.* 143(6):1505-21.
34. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. *WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis*. 2012. *Lancet Infect Dis.* 12(2):136-41.

35. Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ, Balch WE. *GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex*. 1992. *J Cell Biol.* 119:749–761.
36. Tokarev AA, Alfonso A, Segev N. *Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways*. En: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin: Landes Bioscience; 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7286/>.
37. Torres-Flores JM, Silva-Ayala D, Espinosa MA, López S, Arias CF. The tight junction protein JAM-A functions as a coreceptor for rotavirus antry into MA104 cells. 2015. *Virology.* 15(475):172-178.
38. Trask SD, McDonald SM, Patton JT, *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication*. 2012. *Nat Rev Microbiol.* 10(3):165-177.
39. Trejo-Cerro O, Eichwald C, Schraner EM, Silva-Ayala D, López S, Arias CF. *Actin-dependent non-lytic rotavirus exit and infectious virus morphogenetic pathway in non-polarized cells*. 2017. *J Virol.* [Epub ahead of print]
40. Weiss WA, Taylor SS, Shokat KM. *Recognizing and exploiting differences between RNAi and small-molecule inhibitors*. 2007. *Nat Chem Biol.* 3(12):739-44.
41. Yen C, Tate JE, Hyde TB, Cortese MM, Lopman BA, Jiang B, Glass RI, Parashar UD. *Rotavirus vaccines: current status and future considerations*. 2014. *Hum Vaccin Immunother.* 10(6):1436-1448.
42. Yorimitsu T, Sato K, Takeuchi M. *Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants*. 2014. *Front Plant sci.* 5:411.