

Premio Área de Ciencias Básicas

Interferencia de la infección por rotavirus mediante la inhibición de la actividad de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) de la membrana celular de las líneas MA104 y Caco-2

Carlos A. Guerrero¹, Martha N. Calderón²,
Oriando Acosta¹, Fanny Guzmán²

Resumen

Los rotavirus son la causa más común de gastroenteritis severa en niños menores de cinco años, ocasionando episodios diarreicos agudos responsables de 454.000 a 705.000 muertes anuales a nivel mundial. Aunque la frecuencia de infección con rotavirus es muy similar a través del mundo, en los países en desarrollo la gastroenteritis rotaviral es la mayor causa de muerte infantil. La diarrea rotaviral severa cursa con vómito y fiebre, produciendo deshidratación con shock, desbalance electrolítico, y muerte si ésta no es tratada. En los países desarrollados, la infección rotaviral es responsable del 30-50% de las hospitalizaciones debidas a gastroenteritis en menores de 5 años. Además, los rotavirus son una causa importante en la gastroenteritis nosocomial.

En el ciclo de infección viral, la etapa de entrada del virus a la célula hospedera es un evento candidato a ser interferido con el fin de evitar o atenuar la infección viral. Tal propósito requiere del conocimiento detallado del mecanismo molecular y celular implicado. En este contexto, en un trabajo original previo los autores aislaron cuatro proteínas

(Hsc70, integrina $\beta 3$, actina y miembros de la familia PDI) candidatas a jugar un papel como receptores en el proceso de entrada del rotavirus a la célula. De estas proteínas, la Hsc70 y la integrina $\beta 3$ han sido descritas como receptores en el proceso infeccioso en trabajos publicados por el autor principal y confirmadas otros investigadores en diferentes países. Actina ha sido relacionada con el proceso replicativo y salida del virión de la célula infectada, en reportes de otros investigadores. La familia de las PDI, hasta el momento, no ha sido reportada en publicaciones internacionales como componente del proceso de entrada de los rotavirus a la célula. En el presente trabajo, por primera vez se reporta la participación de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) en el proceso de entrada de los rotavirus.

Actualmente han sido descritas varias moléculas receptoras implicadas en la unión inicial (adherencia) de la partícula rotaviral a la superficie de la célula y en los eventos subsiguientes de pos-adherencia. Tales moléculas receptoras incluyen las integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$) y la proteína de choque térmico Hsc70 de la membrana celular. Aparentemente, de acuerdo con la cepa rotaviral y la especie animal

¹ Laboratorio de Biología Molecular de Virus, Facultad de Medicina.

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

infectada, los virus presentan preferencias hacia una u otra molécula receptora, sin perjuicio de la utilización secuencial de más de una proteína receptora.

Como parte del mecanismo propuesto, las proteínas estructurales de la partícula viral o diferentes partes de éstas (dominios), interactúan secuencialmente con las moléculas de la superficie celular. Nuestra hipótesis presupone la ocurrencia de modificaciones o rearrreglos de la estructura tridimensional (denominados cambios conformacionales) de las proteínas de la partícula viral. Para que estos cambios conformacionales se sucedan, es necesaria la presencia en la superficie de la membrana celular de proteínas que los realicen. Entre las proteínas candidatas a realizar estos rearrreglos tridimensionales se encuentran las proteínas de la familia disulfuro isomerasa (PDIs), las cuales presentan actividad isomerasa a través de reacciones de óxido-reducción (redox) que interconvierten los grupos tiol/disulfuro (-SH/-S-S-) de las cisteínas que hacen parte de la secuencia de aminoácidos de las proteínas, ocasionando de esta manera cambios conformacionales alternativos (isómeros) en las proteínas sobre las cuales actúan las PDIs.

Esta actividad redox está documentada en el retículo endoplásmico (RE), donde contribuye en el proceso de ensamblaje de partículas virales y en el plegamiento de sus proteínas junto con calnexina y calreticulín. Con base en los anteriores antecedentes, decidimos determinar la implicación de la actividad de PDI de la membrana citoplasmática de las líneas celulares MA104 y Caco-2 en el evento de entrada de los rotavirus a estas células. Planteamos como objetivo general determinar la interferencia del proceso infeccioso del rotavirus cuando se inhibe la actividad de las proteínas PDIs. Como parte del cumplimiento de los objetivos específicos se desarrolló una metodología la cual incluyó:

1. Inhibición de la actividad redox presente en la membrana celular con DTNB (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzónico)) y bacitracina, reactivos que no son permeables a esta membrana, asumiendo que al inhibir esta actividad el virus no puede realizar los cambios conformacionales necesarios para las interacciones subsecuentes con las distintas moléculas de la superficie celular, disminuyendo así la infección viral.
2. Utilización de anticuerpos contra proteínas específicas de la familia de las PDIs, para determinar cuál de ellas está implicada en la entrada de

los rotavirus a células MA104. Se asumió que al bloquear con anticuerpos las proteínas de la superficie celular de esta familia, el rotavirus no puede interactuar con éstas, hecho que conlleva a la disminución de la infección viral.

3. Una vez establecido que los anticuerpos que inhiben la infección viral son los dirigidos contra la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la ubicación en la superficie celular de esta proteína se confirmó aún más utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo y marcaje con biotina (biotinilación) de proteínas de la superficie celular con un reactivo (Sulfo NHS-SS-Biotin) impermeable a la membrana celular, seguido de la separación de estas proteínas biotiniladas por su afinidad con la proteína avidina y análisis de esas proteínas mediante la técnica de "Western blotting" (separación de proteínas por electroforesis en gel y transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa, para su detección con anticuerpos específicos).
4. Teniendo en cuenta que la proteína Hsc70 y la integrina $\beta 3$ están presentes en la membrana citoplasmática, en microdominios lipídicos denominados "rafts" (o también balsas lipídicas), se determinó si PDI de la membrana celular también está presente en dichos microdominios lipídicos y, si en caso de estarlo, si su interacción es directa o indirecta con las anteriores proteínas. Para esto, el componente lipídico de los "rafts" fue removido y las proteínas remanentes se examinaron mediante "Western blotting".
5. Determinación de la interacción entre PDI y el virión en ensayos *in vitro* e *in vivo* mediante ELISA y "Western blotting" analizando la formación de complejos proteicos entre estas dos entidades. También se examinó si al adicionar el virus a las células y extraer los microdominios lipídicos "rafts", en éstos se localizaría la PDI en interacción con las proteínas estructurales del rotavirus.
6. Se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes a regiones de proteínas estructurales de rotavirus, que incluyen cisteínas (aminoácido sustrato de PDI a través el grupo -SH) en su secuencia, con el propósito de identificar los dominios de las proteínas virales que son sustrato de la PDI, realizando ensayos de infección de la célula en presencia y ausencia de los péptidos; se determinó además la interacción entre la PDI y los péptidos.

El aminoácido cisteína, a través del grupo tiol (-SH), puede generar mediante oxidación puentes disulfuro (-S-S-), lo cual produce cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína así oxidada. Igualmente, la reducción de los puentes de disulfuro para regenerar los grupos tiol, también ocasiona cambios conformacionales en la proteína reducida. Aunque la PDI interactúa con las proteínas de dos formas: (i) a través de la actividad redox (intercambio tiol/disulfuro) sobre las cisteínas, o (ii) a través de la actividad de "chaperona" (acompañamiento en la solubilización y transporte de proteínas independientemente del intercambio tiol/disulfuro), se enfatizó en el análisis de la actividad redox. Para esto, se utilizaron los péptidos sintéticos (con sus respectivos controles) en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los controles incluyeron péptidos sintéticos con la misma secuencia de aminoácidos pero con las cisteínas cambiadas por serinas, los mismos aminoácidos en secuencias aleatorias o péptidos con secuencias no relacionados con las proteínas de rotavirus pero que contuvieran cisteínas.

Con el objeto de determinar si el dominio de la estructura tridimensional de la proteína que contiene la secuencia peptídica sintética se encuentra expuesta en la partícula viral (virión), se generaron en conejos anticuerpos contra algunos de los péptidos sintéticos para determinar si dichos anticuerpos reconocían las proteínas del virión y si eran capaces de bloquear la infección viral.

Los resultados del presente trabajo sugieren lo siguiente:

1. En este trabajo se reporta por primera vez que la PDI se localiza en la superficie de la membrana celular de las células MA104 y Caco-2, permisivas a la infección por rotavirus, en una concentración muy inferior a la encontrada en el interior de la célula.
2. La infección con las cepas de rotavirus RRV o Wa disminuyó cuando las líneas celulares utilizadas se incubaron previa o simultáneamente con las partículas virales infecciosas y con los inhibidores de la actividad redox de la superficie de la membrana celular, tales como bacitracina y DTNB en concentraciones que no son tóxicas para la célula. Estos reactivos no impidieron la unión (adherencia) del virus a la célula y no inhibieron la replicación viral cuando se adicionaron después que el virus ingresó a la célula. Esto

sugiere que la actividad redox es importante para el ingreso del virus a la célula, probablemente induciendo en las proteínas del virión cambios conformacionales necesarios para exponer dominios de las proteínas necesarios para interactuar con otras proteínas receptoras de la membrana celular.

3. La infección del rotavirus se inhibe al preincubar las células con anticuerpos específicos anti-PDI. Los anticuerpos dirigidos contra otras proteínas de la familia de las PDIs no mostraron efecto inhibitorio sobre la infección viral. La inhibición de la infección con anticuerpos anti-PDI fue mayor que la realizada por los reactivos que inhiben la actividad redox, probablemente porque también están interfiriendo la actividad de "chaperona", en el caso que esta actividad también estuviera implicada en la entrada del rotavirus. Los anticuerpos anti-PDI no impidieron la unión (adherencia) del virus a la célula. Esto sugiere que al bloquear la PDI con anticuerpos, su interacción con el virión se ve abolida, interfiriendo de esta manera los cambios conformacionales de las proteínas virales requeridos para las interacciones subsecuentes conducentes a la internalización del virus.
4. La PDI se une a los viriones purificados (TLPs, partículas con triple cubierta protéica) de las cepas rotavirales RRV o Wa, de acuerdo con los resultados obtenidos en un sistema *in vitro* libre de células, en el cual la PDI soluble fue analizada mediante ELISA y "Western blotting". La unión de PDI y el virión disminuye en presencia DTNB, reactivo que interfiere la actividad redox de la PDI. Los resultados sugieren que PDI interacciona con las partículas rotavirales, probablemente a través de los grupos tiol/disulfuro asociados a las cisteínas, sin descartar la posible interacción mediada por la función "chaperona" de PDI.
5. La entrada del virus a la célula se bloqueó al incubarla con péptidos sintéticos correspondientes a regiones de proteínas virales que contienen cisteínas, como también con los anticuerpos generados contra dichos péptidos. La unión de los péptidos sintéticos a la PDI fue disminuida notoriamente, así como la inhibición de la infección de las células, como consecuencia del cambio de las cisteínas por serina en la secuencia de los péptidos. Sin embargo, al cambiar las cisteínas por serinas el

efecto inhibitorio de los péptidos no desapareció totalmente. En su conjunto, estos experimentos sugieren que los dominios de las proteínas virales que contienen las secuencias peptídicas ensayadas son posibles sustratos de la PDI.

6. La PDI aquí descrita se encuentra presente sobre la membrana de las células haciendo parte de los microdominios lipídicos "rafts", formando complejos proteicos con la proteína Hsc70 y la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Esto sugiere que en estas líneas celulares la PDI está relacionada, mediante interacciones proteína-proteína, con la Hsc70 y la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y que este complejo proteico participa en la entrada del rotavirus a la célula.

En resumen, los resultados aquí presentados permiten fortalecer el mecanismo propuesto consistente en que el rotavirus interactúa con varias proteínas de la membrana celular, de las cuales, la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, la Hsc70 y la PDI forman un complejo proteico. Durante su entrada el rotavirus estaría utilizando diferentes proteínas virales o diferentes dominios de ellas, en un evento secuencial de múltiples interacciones con las distintas moléculas receptoras de la membrana celular. Para que se produzcan los cambios conformacionales requeridos por las proteínas virales, la actividad de la PDI en membrana debe intervenir, dado que al bloquear esta actividad con anticuerpos o con diferentes reactivos, se disminuye la infección viral.

Este trabajo reporta por primera vez a nivel internacional, que la PDI está implicada en el proceso de entrada de los rotavirus a la célula al menos a través de su actividad redox. Este hallazgo es de gran importancia puesto que nos ha permitido iniciar la búsqueda de herramientas terapéuticas ya existentes o en experimentación, que interfieran la actividad enzimática disulfuro-isomerasa y en consecuencia coadyuven en la lucha contra la infección por rotavirus.

Preliminarmente se han analizado diferentes moléculas con la propiedad de interferir el intercambio tiol-disulfuro que podrían ser de mucha utilidad para casos en los que las vacunas, recientemente liberadas al mercado y aun en estudio, presenten poca eficiencia o no sean de fácil acceso, como sucede en áreas socio-económicamente deprimidas en los países en desarrollo. Igualmente, estos métodos profilácticos podrían ser utilizados en los animales de interés zootécnico, para los cuales en la actualidad no se han desarrollado vacunas.

Introducción

El rotavirus ha sido reconocido como el principal agente causal de gastroenteritis severa en niños. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta entre 454.000 y 705.000 muertes de niños debido a la infección producida por rotavirus. El 82% de estas muertes ocurre en los países en vías de desarrollo, primordialmente en África y Asia, mientras que en los países desarrollados es una importante carga asistencial, con un costo socio-económico alto pero con una baja mortalidad. (Parashar et al., 2006). También afecta especies animales de importancia económica (bovinos, porcinos, aves) (Yaeger y Anderson, 2003) y hay reportes que indican transmisión de rotavirus de animales a humanos (Matthijnssens, et al., 2006; Martella et al., 2006). Después de la primera vacuna tetravalente recombinante de rotavirus, la RotaShield, retirada del mercado por asociarse a casos de intususcepción, dos nuevas vacunas, Rotarix y RotaTeq han mostrado seguridad y eficiencia para proteger de la gastroenteritis rotaviral, con reportes que oscilan entre el 74% y 100% (Angel et al., 2007; Dennehy, 2007).

El rotavirus, perteneciente a la familia Reoviridae, es un virus icosaédrico que carece de envoltura bilipídica, cuyo genoma está compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena protegido por tres capas protéicas concéntricas, que incluyen 6 proteínas estructurales (VP). La capa interna la conforma la proteína VP2 formando la nucleocápside que envuelve el genoma viral y a las proteínas VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA) y VP3 (guanilil-transferasa y metilasa). La capa intermedia la forma la proteína VP6 conformando partículas de doble capa o DLPs, transcripcionalmente activas pero no infecciosas; la capa externa está compuesta por dos proteínas, VP7 y VP4, que estructuran la partícula infecciosa de triple capa protéica o TLPs. Trímeros de VP7 conforman una superficie lisa mientras que VP4 se extiende hacia afuera con estructuras diméricas en forma de espículas (Estes, 1996 y 2001). Ambas proteínas se han reportado como las principalmente involucradas en las interacciones del virus con la célula hospedera (López y Arias, 2004).

Los rotavirus infectan principalmente enterocitos maduros en las vellosidades del intestino delgado, con propagación de la infección fuera del intestino hacia los nódulos linfáticos mesentéricos y tejidos

periféricos (Mossel y Ramig, 2003; Fenaux et al., 2006; Blutt et al., 2007); in vitro, infectan a diferentes líneas celulares, en especial células epiteliales de origen renal, intestinal y hepático, entre ellas las Vero y MA104 de riñón de mono verde africano, y las Caco-2 de cáncer de colon humano (Londrigan et al., 2000; Ciarlet et al., 2002a). Estas líneas han sido los principales modelos celulares en la elucidación de los mecanismos de entrada, replicación e infección de rotavirus; sin embargo muchos de los eventos moleculares de entrada, ensamblaje y salida del rotavirus aún son objeto de investigación.

La unión (adherencia) de algunos rotavirus a la célula hospedera es dependiente de la presencia de ácido siálico (AS) en la superficie celular. También están implicadas como receptores rotavirales varias integrinas ($\alpha 1\beta 2$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$) y la proteína Hsc70, especialmente en el proceso de post-adherencia (Superti et al., 1991; Coulson et al., 1997; Hewish et al., 2000; Guerrero et al., 2000a; Guerrero 2002; Ciarlet et al., 2002; Zarate et al., 2004; Gram et al., 2005; Gualtero et al., 2007). Varias de estas moléculas receptoras y las proteínas rotavirales VP4, VP6 y VP7 han sido asociadas con los microdominios lipídicos "rafts" durante los eventos iniciales de la entrada del rotavirus a la célula (Isa et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual las integrinas y la proteína Hsc70 participan en la internalización del virus hacia el citoplasma celular todavía no está definido.

Al parecer, la infección es un evento de múltiples pasos e interacciones secuenciales que sugiere cambios conformacionales (modificaciones de la estructura tridimensional) en las proteínas del virión, los cuales permiten exponer diferentes dominios (regiones de la proteína) para proseguir con la unión y penetración a la célula (Méndez et al., 1999; López et al., 2004; Halasz et al., 2005; López et al., 2006; Gualtero et al. 2007).

La enzima tripsina induce uno de los primeros cambios estructurales descritos sobre la proteína VP4, mediante el corte de la secuencia de aminoácidos en la región 241-247 con producción de las proteínas VP8 y VP5, lo cual se refleja en un aumento de la infectividad del rotavirus (Estes et al., 1981; López et al., 1985; Arias et al., 1996). Se ha propuesto que la acción de la tripsina podría estar afectando la conformación de VP7, que conlleva a la permeabilización de la membrana independientemente

de VP4 (Charpilienne et al., 1997). La estructura de la partícula viral también es dependiente de la concentración de calcio y la configuración trimérica de la proteína VP7 se estabiliza con este ión, al parecer mediando cambios conformacionales que estarían contribuyendo en parte a los cambios que sufre VP7 en el proceso de internalización. Esto explicaría el aumento de la infectividad viral con el incremento en la concentración de calcio (Shah Rabadi et al., 1987; Fajardo et al., 1997; Pando et al., 2002).

Se ha sugerido que durante la infección la interacción del virus con la proteína Hsc70 de la superficie celular implica reconocimiento de dominios que están localizados en regiones proteicas no expuestas en el virión, como la porción carboxi-terminal de la proteína VP5. Esta interacción también podría incluir la región 280-297 de la proteína VP6 (Pérez-Vargas, J. 2006; Gualtero et al. 2007).

Un posible mecanismo para la exposición de estos dominios podría requerir de una actividad enzimática celular que le permita a las proteínas del virus ser objeto de reacciones de intercambio tiol (-SH)/disulfuro (-S-S-), en las cisteínas presentes en las proteínas de la cubierta del virus. Las proteínas con actividad disulfuro isomerasa (PDIs) asociadas a la membrana celular son las moléculas candidatas a realizar este proceso. El objetivo de este trabajo fue elucidar si las proteínas con actividad disulfuro isomerasa de la superficie celular están relacionadas con el proceso de entrada de los rotavirus RRV y Wa a las células Ma104 y Caco-2.

Las PDIs constituyen una familia de enzimas estructuralmente relacionadas que catalizan la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro, principalmente de las nuevas proteínas sintetizadas en el lumen del retículo endoplasmático. Las PDIs actúan como "chaperonas" y por ello hacen parte del sistema de vigilancia del correcto plegamiento de las proteínas (Xiao et al., 2005). Un miembro de esta familia es la PDI (EC 5.3.4.2), una oxido-reductasa cuya función redox involucra la secuencia aminoacídica distintiva (motivo) Cys-Gly-His-Cys (CXXC), que constituye el sitio activo de la enzima localizado en los dominios a y a' de esta proteína (Freedman et al., 1989).

La PDI también está presente en la superficie celular, aunque carece del sitio clásico de unión a membrana, y se encuentra en concentraciones muy inferiores a las determinadas en el retículo endo-

plásmico (Ryser et al., 1997). La PDI de la membrana celular se ha involucrado en el mantenimiento del estatus reductivo de la membrana plasmática, también en procesos que incluyen adhesión celular, maduración de las plaquetas, transporte de óxido nítrico, modulación de la actividad de la trombospodina e interacción con el ectodominio del receptor de la tirotrina humana (Pariser et al., 2000; Bennett et al., 2000; Essex et al., 1995; 2000; Essex et al., 2001; Ramachandran et al., 2001; Huang et al., 1997; Couet et al., 1996).

PDI actúa en la reducción de uno de los puentes disulfuro de la toxina de la difteria requerido en la entrada a las células; se sugiere que PDI cataliza la remodelación de la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) en el proceso de entrada y por ello se ha postulado la PDI como un blanco potencial en terapias anti-HIV (Mandel et al., 1993; Barbouche et al., 2005, Ryser et al., Fluckiger et al., 2005).

Dentro de la investigación de la búsqueda de receptores celulares para rotavirus, el análisis de las proteínas obtenidas a partir de un extracto derivado del tratamiento de las células MA104 con el detergente no iónico octil- β -glucósido en condiciones en que no ocurre lisis celular, permitió aislar proteínas con habilidad de bloquear eficientemente la infección por rotavirus (Guerrero, 2000b). En este estudio, el Dr. C.A. Guerrero (2000b) determinó que la proteína de 73KDa compartía en 100% identidad con la proteína Hsc70, caracterizándola como receptor de post-adherencia para rotavirus; mientras que la proteína de 57 KDa fue relacionada con dos miembros de la familia de las PDIs (Guerrero et al., 2000; 2002c).

Los resultados del presente trabajo dan evidencia de la inhibición de la infección rotaviral cuando se bloqueó la actividad redox de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) asociada a la membrana celular con reactivos como el DTNB y la bacitracina o con anticuerpos específicos contra la PDI. De igual forma, se analizaron péptidos rotavirales que estarían actuando como posibles sustratos de la enzima, inhibiendo por competencia la infección de las células MA104 con la cepa rotaviral RRV. Además, se demostró que la PDI asociada a la membrana celular de células permisivas a la infección por rotavirus forma complejos proteicos con este virus.

Materiales y Métodos

Líneas celulares y cepas de rotavirus

La infección rotaviral se analizó en las líneas celulares MA104 y Caco-2. Las cepas rotavirales analizadas fueron: Wa (origen humano), RRV (origen simiano) y Ym (origen porcino) procedentes del laboratorio del Doctor Carlos Arias, de la Universidad Autónoma de México. El rotavirus fue propagado en células MA104, previo tratamiento del virus con 10 μ g/ml de tripsina a 37° C por 30 minutos y con adición de 10 mM de CaCl₂, justo antes de ser inoculado a las células MA104 (Pando V., 2002). El lisado celular se congeló y se descongeló con el fin de liberar el virus intracelular y el adherido a la membrana. El lisado celular infectado fue titulado y almacenado a -70°C en alícuotas hasta su uso.

Purificación y modificación de partículas virales

Las partículas virales (TLPs) se purificaron mediante extracción con Freón, centrifugación diferencial seguida de separación en gradientes discontinuos de sacarosa y CsCl en buffer TNC (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.5) (Pavel, I., 2004), colectando las bandas que contenían las TLPs y DLPs. Alternativamente, una alícuota de la preparación viral antes de ser colocada en los gradientes discontinuos de sacarosa y CsCl, se trató con 55 mM de iodoacetamida en buffer TNC, con el fin de alquilar cualquier cisteína libre y accesible en la partícula viral (Cuadras et al., 1998).

Titulación viral e inmunocitoquímica

El lisado de células infectadas con las cepas de rotavirus y las TLPs se titularon para establecer la dilución viral que permitiera obtener alrededor de 100 unidades formadoras de foco (UFF) (relación de unidades infecciosas por célula) a lo largo del campo de observación con el microscopio invertido en un aumento 20X; con esa dilución se realizaron los ensayos de infectividad. Células MA104 confluentes se infectaron con diluciones seriadas del lisado viral previamente tratado con tripsina. Después de una hora de adsorción del virus, las células fueron incu-

badas con MEM (Medio Mínimo Esencial de Eagle) por 12 h a 37°C. Las células fueron pre-enfriadas y fijadas en metanol por 45 min a 4°C. Para el ensayo inmunocitoquímico se adicionó un suero policlonal contra rotavirus preparado en conejo (producido en nuestro laboratorio), se incubó por 1 h a 37°C, seguido de tres lavados con PBS (buffer fostafo salino: Cloruro de Potasio 2.7 mM, Fosfato de Potasio 1.8 mM, Cloruro de Sodio 137 mM, Fosfato de Sodio 10 mM). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). La placa se reveló con aminoetilcarbazol 0.25 mg/ml en 50 mM de buffer de acetato de sodio pH 5.2 y peróxido de hidrógeno al 0.04%.

Estudio de inhibidores de la actividad disulfuro isomerasa en ensayos de infección con rotavirus

La función de la PDI fue inhibida por los reactivos químicos DTNB y bacitracina (Sigma St Louis, MO, U.S.A), a los cuales es impermeable la membrana celular. Previamente se determinaron las dosis no tóxicas de estos reactivos durante todo el proceso de infección celular mediante los métodos de azul de Tripán y MTT [3-(4,5 dimetilazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium]. Para determinar el efecto de los inhibidores sobre la infección viral, monocapas celulares distribuidas en placas de 96 pozos, se incubaron con diferentes concentraciones de los inhibidores por 30 minutos a 37°C, se adicionó el virus y se continuó con el proceso de infección e inmunocitoquímica. Cada experimento se realizó por duplicado, repitiéndose tres veces. El 100% de infección corresponde a células infectadas en ausencia de inhibidor. La etapa del evento infeccioso afectada por los inhibidores DTNB y bacitracina se determinó modificando los tiempos y temperaturas de incubación de la siguiente manera: (a) adicionando los inhibidores a las células e incubando por 30 min y luego retirándolos con lavado antes del desafío con el virus, (b) dejando los inhibidores permanentemente durante todo el experimento, (c) adicionándolos simultáneamente con el virus, y (d) adicionándolos una hora después del inicio de la etapa de post-entrada. Para determinar el efecto de los inhibidores sobre el virus, éste se incubó con 30mM de DTNB por 30 minutos a 37°C, seguido de dilución de la mezcla virus-DTNB hasta obtener una concentración 1.5 mM de DTNB y un MOI de 0.5. Esta

mezcla diluida se incubó con las células a 37°C por 12 h como se describió anteriormente. Para los ensayos de unión virus-célula, las células se preincubaron con los inhibidores a 37°C; luego este complejo se enfrió sobre hielo por 5 minutos y se adicionó el virus preenfriado; el complejo virus-célula se incubó a 4°C por 1 h. Las células se lavaron con MEM preenfriado, se lisaron y el virus unido fue medido mediante ELISA de captura.

Para determinar el efecto específico de la actividad de PDI sobre la infección rotaviral, las células se preincubaron durante 30 minutos a 37°C, con los anticuerpos anti-PDI (Mouse IgG1 monoclonal - Stressgen), anti-PDI (Goat polyclonal IgG), anti-ERp57 (Goat polyclonal IgG), anti-Calregulin (rabbit polyclonal IgG) anti-calnexin (rabbit polyclonal IgG), todos ellos obtenidos de Santa Cruz. Como control, se utilizaron células incubadas con un anticuerpo irrelevante (isotipo). Las células fueron retadas con el virus y se continuó con el proceso de infección durante 12 horas, como se describió anteriormente.

Localización de PDI sobre la membrana celular

Para detectar la presencia de la PDI en la membrana citoplasmática mediante inmunofluorescencia, las células se sembraron en laminillas hasta confluencia de 80%, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incubaron con el monoclonal anti-PDI IGg1 monoclonal (Stressgen) a 4 µg/ml y con el anticuerpo secundario anti-ratón-FITC (Santa Cruz Biotechnology). Se detectó la fluorescencia en un microscopio VanGuard 1486 FL, comparando la intensidad de las células tratadas con aquellas del control. Estos resultados se corroboraron mediante el uso de citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences). Para esto, 5 x 10⁵ células se trataron con PBS 1X - EDTA 2 mM para obtenerlas en suspensión y fueron mantenidas a 4°C; se incubaron con 4 µg/ml de anti-PDI monoclonal (Stressgen) diluido en MEM-BSA al 1%. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón-FITC disuelto en PBS-BSA al 1%. Otra fracción celular se trató con 7-AAD (7 amino-actinomicina D) (Pharmin-gen) como control de viabilidad.

Para confirmar la presencia de PDI asociada a la membrana, se realizó el marcaje con biotina de las proteínas asociadas a la superficie externa de la membrana celular, con el reactivo reversible Sulfo

NHS-SS-Biotin (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las monocapas celulares dispuestas en placas de seis pozos, se lavaron con PBS frío para retirar todas aquellas moléculas con grupos amino libres. Se adicionó una solución 5mM de Sulfo NHS-SS-Biotin, se incubó por 30 minutos, se agotó el reactivo en exceso con tris-HCl 20 mM, se realizó la lisis celular y se aislaron las proteínas biotiniladas con agarosa-avidina.

Las proteínas inmovilizadas por la agarosa-avidina, y aquellas presentes en el sobrenadante, se separaron mediante electroforesis desnaturante bajo condiciones reductoras y no reductoras, con el objeto de detectar la biotina incorporada a las proteínas en ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol (2-ME). Las proteínas separadas electroforéticamente a una membrana de PVDF y el "Western blot" se analizó con avidina-HRP (peroxidasa de rábano) y anticuerpos anti-PDI. Otra fracción de este lisado celular biotinilado fue analizado por ELISA de captura utilizando alternativamente anticuerpos anti-PDI generados en conejo o proteína avidina para capturar la proteína biotinilada, la detección del complejo capturado se realizó con avidina-HRP, y anticuerpos anti-PDI, respectivamente.

Localización de PDI en los microdominios lipídicos "rafts"

Las células MA104 (1 x 10⁷) se trataron con buffer de lisis (50mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 2 mM de DTT y 1% de Triton X-100) en presencia de 2 mM de PMSF (fenilmetil sulfonilfluoruro) (Sigma) y 1mM de EDTA a 4°C. El lisado se sometió a centrifugación en un gradiente lineal de sacarosa (5-40%) a 4°C. Como control se utilizó una preparación derivada de células tratadas con 10 mM de metil β -ciclodextrina (Sigma, St Louis, MO, U.S.A) por 1 hora a 37°C, con el objeto de secuestrar el colesterol para desestabilizar los microdominios "rafts" (Isa et al., 2004). Después de la centrifugación se tomaron fracciones sucesivas de 500 μ l iniciando desde la parte superior del tubo y terminando en el fondo; cada fracción fue tratada con 0.2% de octil glucósido, 1% de Tritón X-100, y 10 mM de metil- β -ciclodextrina durante 30 min a 37°C para deshacer los "rafts" y permitir evaluar la interacción proteína-proteína. Estas fracciones fueron analizadas por "SDS-PAGE-Western Blotting", co-inmunoprecipitación y ELISA de captura.

La co-inmunoprecipitación se realizó adicionando a las diferentes fracciones procedentes del gradiente de sacarosa, anticuerpos policlonales anti-PDI, incubándolos por 1 hora a 37°C. El complejo antígeno-anticuerpo fue inmunoprecipitado con proteína A-sepharosa (Biorad). El inmunoprecipitado se analizó por "SDS-PAGE-Western blotting", incubando la membrana con anticuerpos anti-integrina β 3 y anti-Hsc70. Para el ELISA se utilizó como anticuerpo de captura anti-PDI generado en conejo; cada fracción del gradiente de sacarosa tratada con los detergentes como se indicó antes, se adicionó a las placas de ELISA y se realizó la detección de los complejos protéicos con los anticuerpos anti-ERp57, anti- β 3 y anti-Hsc70, todos ellos generados en cabra. Las reacciones de los anticuerpos fueron reveladas mediante el sistema de conjugado- peroxidasa-OPD.

Modificación de los grupos tiol sobre la superficie celular

La marcación de los grupos tiol de las proteínas virales y de la superficie celular se realizó con Biotinyl-3-maleimidopropionamidy-3-6-dioxaoctanediamine (EZ-link Maleimide PEO2-Biotin de Pierce). A las monocapas de células MA104 preincubadas en presencia y ausencia de DTNB se les adicionó simultáneamente rotavirus purificado (TLPs de RRV) y 0.6 mM del reactivo EZ-link Maleimide PEO2-Biotin. El reactivo de biotina no reaccionante se trató con GSH (glutathion reducido) (Markovic et al., 2003). Alternativamente, el reactivo de biotina se adicionó a las TLPs, o también a monocapas celulares sin virus. Las células se lavaron y se lisaron con buffer de lisis (PBS pH 7.5, 0.1% SDS, 1.5% Triton X-100) en presencia de PMSF. Una fracción de este lisado se analizó por ELISA, capturando con anti-rotavirus, o anti-PDI y reconociendo las proteínas capturadas con anti-PDI o anti-rotavirus respectivamente; la placa fue revelada con el sistema HRP-OPD. Para detectar la incorporación de la biotina, otra fracción de las proteínas capturadas con anti-rotavirus o anti-PDI fueron analizadas con avidina-HRP (Pierce).

Péptidos sintéticos y anticuerpos anti-péptidos

Con base en un análisis de las secuencias de las proteínas rotavirales VP7 y VP4, las cuales contienen

cisteínas, se seleccionaron péptidos con tamaños entre 19 y 22 residuos aminoácidos, que fueron sintetizados en fase sólida por la estrategia F-moc. Los péptidos se caracterizaron por espectrometría de masas Maldi-Tof y cromatografía HPLC. Se incluyeron secuencias control en las que se cambió la cisteína por serina, así como también el péptido con la secuencia de aminoácidos en desorden y secuencias no relacionadas con rotavirus que contienen o no contienen cisteínas (Tabla 1). A los péptidos se les analizó su posible efecto tóxico sobre las células realizando un ensayo de viabilidad mediante azul de Tripán y MTT. Los péptidos, designados aquí como P2, P6, P8 y P17 (Tabla 1), fueron inoculados en conejos Nueva Zelanda con el esquema de inoculación 0, 20 y 40 días, a una concentración de 1 mg/ml, emulsificados en adyuvante completo de Freund (primera dosis) y con adyuvante incompleto de Freund (segunda y tercera dosis). Se separó una alícuota de suero preinmune de cada conejo, al igual que el suero total después de la tercera dosis. Se determinó la especificidad estos sueros hacia los péptidos y hacia las partículas virales mediante ELISA. Tanto los péptidos como los anticuerpos se analizaron en ensayos de infectividad y de unión como se describió anteriormente.

Interacción PDI-TLPs y PDI-péptidos

PDI soluble (3 µg) purificada de hígado de bovino (Sigma) se adicionó a TLPs de RRV (1 µg), se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos; la muestra se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 40% en PBS con 0.01% de BSA, por 50 minutos a 133.000 x g, con el objeto de precipitar el virus. El precipitado se reconstituyó en PBS y la composición de proteínas fue determinada por "Western blotting", utilizando anticuerpos anti-PDI y anti-rotavirus. La interacción de las proteínas también se analizó mediante ELISA de captura utilizando alternativamente anti-PDI-ratón o anti-rotavirus-cabra como anticuerpos de captura y detectando las proteínas del complejo con anti-rotavirus o anti-PDI, respectivamente. El revelado se realizó con anti-conejo- HRP y el sistema OPD-peroxidasa (Pierce). Igualmente se realizó un ensayo de interacción PDI-péptidos, en una relación molar 1:4 en presencia y ausencia de DTNB, incluyendo un ensayo de competencia añadiendo diferentes concentraciones de péptido a la PDI soluble; después de 30 minutos de interacción, se adicionó el virus (1 µg de TLPs de RRV) y se incubó por otros 30 minutos; el complejo proteico se analizó mediante ELISA de captura.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos de péptidos rotavirales, modificados y no rotavirales

#	PROTEÍNA	POSICIÓN	SECUENCIA
1	VP7	243-264	TCTIRNCKKLGPRENVAVIQV
2	VP7*	243-264	TCTIRNCKKLAPLENVAVIQV
3	VP7*	SerxCys de P2	TSTIRNSKKLAPLENVAVIQV
4	VP7	192-210	TVKVOPLNTQTLGIGCQTT
5		SerxCys de P4	TVKVOPLNTQTLGIGCQTT
6	VP7	189-210	SSCTVKVOPLNTQTLGIGCQTT
7		SerxCys de P6	SSSTVKVOPLNTQTLGIGSQTT
8	VP4 RRV	200-219	TAFODFYIIPREEESTCTEY
9		SerxCys de P8	TAFSDFYIIPREEESTSTEY
10	2Cys, azar P*	No relacionada	FATIDESCTETFRCYPPEEYI
11	VP4wa	213-232	QESKCNEYINNGLPPIQNTR
12	VP& Unión β3	161-169 (CNP)	EWLCNPMDI
13		SerxCys de P12	EWLSNPMDI
14	1Cys	No relacionada	TEKRVTNSKKAVPICLRVIGN
15	3Cys	No relacionada	NRRKSCQACRLRKC Y
16	4Cys	No relacionada	YCAVCNDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHND
17	0Cys	No relacionada	RSIVDIPTALLALVTVALLLK
18	0Cys	SerxCys de P10	FATIDESSTETFRSYPPEEYI
19	0Cys, azar P3	No relacionada	INKVLPRTAVSKTQLISNEVA

* Secuencia modificada, con cambios en el motivo GRP por APL.

Interacción TLPs-PDI de la membrana celular

Para examinar la posible interacción PDI de la membrana celular con las proteínas del rotavirus, células MA104 y Caco-2 previamente marcadas con 5mM sulfo-NHS-SS-biotin, se incubaron con rotavirus RRV durante 30 minutos a 4°C y 15 minutos a 20°C. Después de este tiempo se adicionó 40mM de N-etilmaleimido (NEM) por 30 minutos a temperatura ambiente para alquilar cualquier grupo tiol reactivo al interior de la célula. Las células se lavaron y lisaron en presencia Triton X100. El producto de lisis se analizó mediante ELISA de captura, utilizando anti-PDI y anti-rotavirus alternativamente para capturar y detectar los antígenos. La posible interacción PDI superficial-TLPs se analizó por electroforesis y "Western blotting" de las proteínas biotiniladas previamente inmovilizadas con avidina-agarosa.

Resultados

El proceso infeccioso del rotavirus en células MA104 se interfiere al inhibir la actividad disulfuro isomerasa de la superficie celular.

Se evaluó el efecto de agentes bloqueadores de las reacciones de intercambio tiol(-SH)/disulfuro (S-S-) sobre la membrana de células MA104 durante el proceso infeccioso del rotavirus. Este efecto fue medido usando dos reactivos que no son internalizados por la célula, el DTNB y la bacitracina. La infección del rotavirus se midió mediante inmunocitoquímica, como unidades formadoras de foco (UFF). La infección disminuyó hasta un 70 y 75% cuando se adicionó 30 mM de DTNB y 20 mM de bacitracina, respectivamente, siendo el efecto inhibitorio dependiente de la concentración de reactivo. Las cepas rotavirales (RRV, Wa y YM) evaluadas se comportaron de forma similar en las pruebas de inhibición de la infección con los bloqueadores de la actividad disulfuro isomerasa en las células MA104 (Fig. 1A, B y C). La viabilidad de las células medida por exclusión de azul de Tripán y por ensayo de MTT no se vio afectada por el DTNB en las concentraciones analizadas, mientras que la bacitracina afecta el 100% de la viabilidad de las células MA104 a 40 mM (Fig. 2A). Las células Caco-2 mostraron mayor susceptibilidad a la bacitracina ya que a concentra-

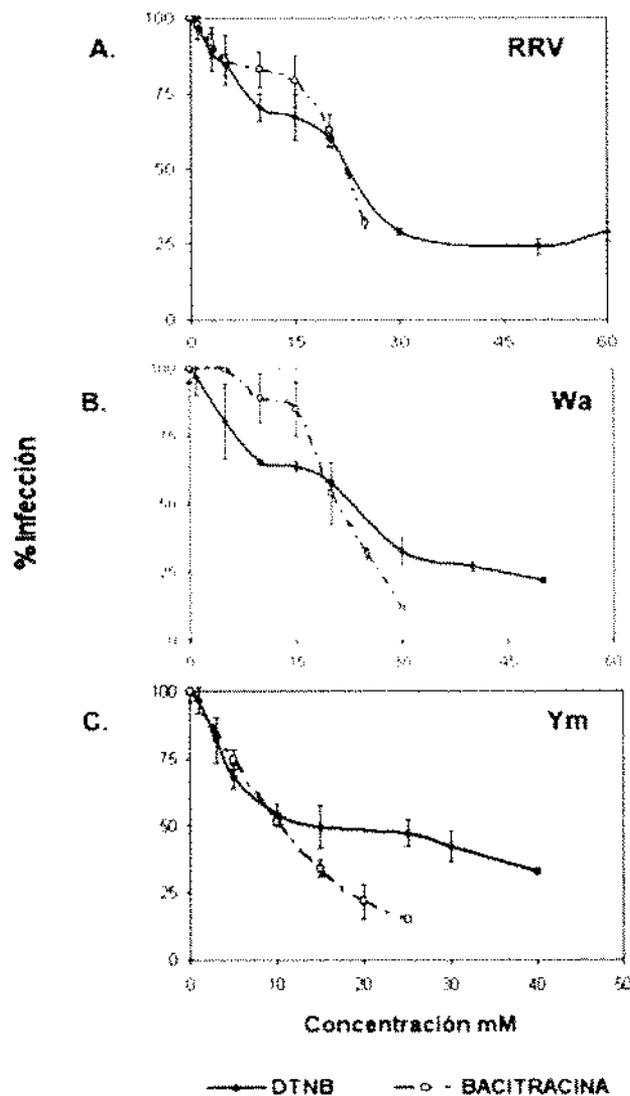


FIGURA 1. Efecto inhibitorio de la infección rotaviral en células MA104 por bloqueadores de la actividad tiol-disulfuro de la membrana celular. Las monocapas celulares fueron incubadas en presencia y ausencia de las concentraciones indicadas de DTNB y bacitracina e infectadas por rotavirus (A. cepa RRV; B. cepa Wa y C. cepa Ym), con MOI 0.5 (0.5 partículas virales por célula). El porcentaje de infección se midió cuantificando el virus como unidades formadoras de foco (UFF) mediante inmunocitoquímica con anti-rotavirus hecho en conejo, y anti-conejo peroxidasa (HRP) aminocarbazol.

ciones superiores 1 mM, tienden a desprenderse después de 12 horas de incubación.

Dado que al bloquear la actividad disulfuro isomerasa sobre la superficie celular de las células MA104 se inhibe el proceso infeccioso del rotavirus, se quiso determinar el momento del proceso infeccioso en el cual la actividad del intercambio tiol-disulfuro está implicada. Para esto, las células se incubaron

con 30 mM de DTNB por 30 minutos a 37°C, luego de este tiempo a una parte de las células se les removió el DTNB por lavados con medio y se procedió a infectarlas con los rotavirus RRV y Wa. Otras células fueron tratadas simultáneamente con el inhibidor y el virus. Los porcentajes de infección obtenidos bajo estas condiciones, indican que la infección rotaviral disminuye hasta un 70% cuando se realiza incubación previa con DTNB o es adicionado simultáneamente junto con el virus.

Cuando se retira el inhibidor con lavados antes del reto viral, se reestablece la infección hasta el 86%. Se obtuvo un porcentaje de infección del 83% cuando el DTNB se adicionó a las células en el periodo de post-adherencia, es decir, una hora después de ser éstas infectadas con el rotavirus. Este resultado indica que este tipo de inhibidor, que no atraviesa la membrana, no altera el proceso de replicación del rotavirus una vez éste se ha internalizado (Fig. 3A).

Para determinar si la acción del inhibidor es hacia las células o hacia el virus, una dosis concentrada de rotavirus fue incubada con 30 mM de DTNB y luego fue diluida hasta 1,5 mM al momento del reto

con las células; bajo estas condiciones la infección rotaviral fue del 93% indicando que el inhibidor no actúa sobre las proteínas virales (Fig. 3A). Ambas cepas rotavirales se comportaron de forma similar en estos experimentos, excepto que la cepa Wa disminuyó su infectividad alrededor de un 20% después del tratamiento de las partículas virales con DTNB, sugiriendo que posiblemente presente en sus proteínas estructurales grupos tiol disponibles para la reacción redox.

La actividad disulfuro isomerasa no parece ser necesaria en el proceso inicial de unión (adherencia) del rotavirus a la célula, ya que al adherir el virus a 4°C por una hora en presencia de DTNB o de bacitracina, no se detectaron diferencias apreciables en la cantidad de virus unido al comparar con monocapas celulares no tratadas (Fig. 3B). Estos resultados sugieren que el DTNB actúa sobre proteínas celulares e interfiere la infección de las células durante el proceso de entrada del rotavirus, en un paso posterior a la unión virus-célula pero anterior a la internalización del virus.

Anticuerpos anti-PDI disminuyen la infección por rotavirus

Para confirmar la especificidad del bloqueo de la actividad disulfuro isomerasa con los inhibidores químicos, se realizó la infección de las células en presencia de anticuerpos contra la proteína PDI. A una concentración de 10 µg/ml de anticuerpo anti-PDI, la infección rotaviral disminuyó de manera dosis dependiente y la inhibición máxima fue del 90% (Fig. 4A). El anticuerpo de conejo usado como control de isotipos no tuvo incidencia alguna sobre la infección, descartando cualquier interacción inespecífica de la región Fc del anticuerpo. De otro lado, al preincubar las células con anticuerpos anti-PDI, y luego adicionar el virus a 4°C por 1 hora, no se detectaron diferencias del virus adherido con respecto a las células sin tratamiento con anticuerpo (Fig. 4B). Estos resultados reafirman que la PDI está implicada en un evento posterior a la unión del virus a la célula.

La interacción de las células con los anticuerpos anti-ERp57 (miembro de la familia de las PDIs) afectó la infección con rotavirus RRV en cerca del 50% solo a concentraciones relativamente altas de anticuerpo (18 µg/ml) y con un perfil lineal sugestivo

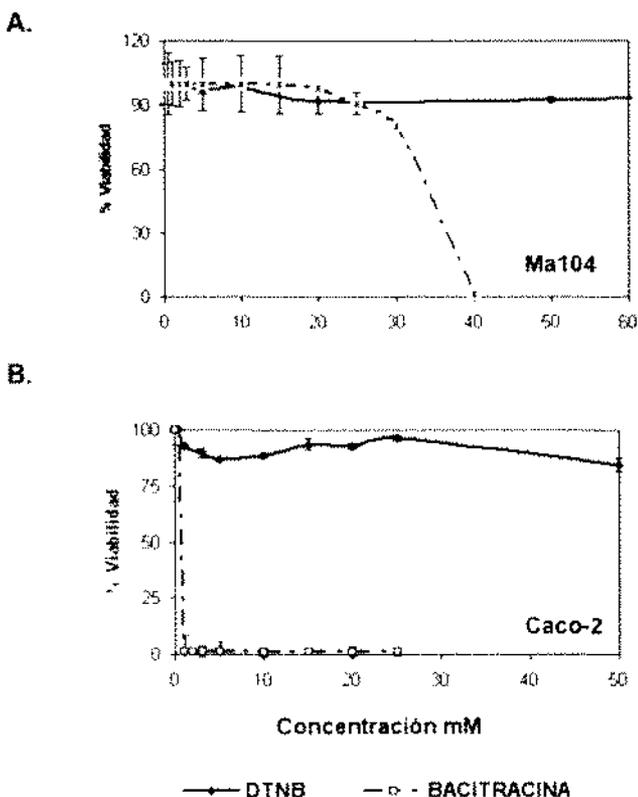


FIGURA 2. Viabilidad de células MA104 (A) y Caco-2 (B) infectadas por rotavirus RRV, medida a las 12 horas de infección por ensayo MTT en presencia de DTNB, bacitracina.

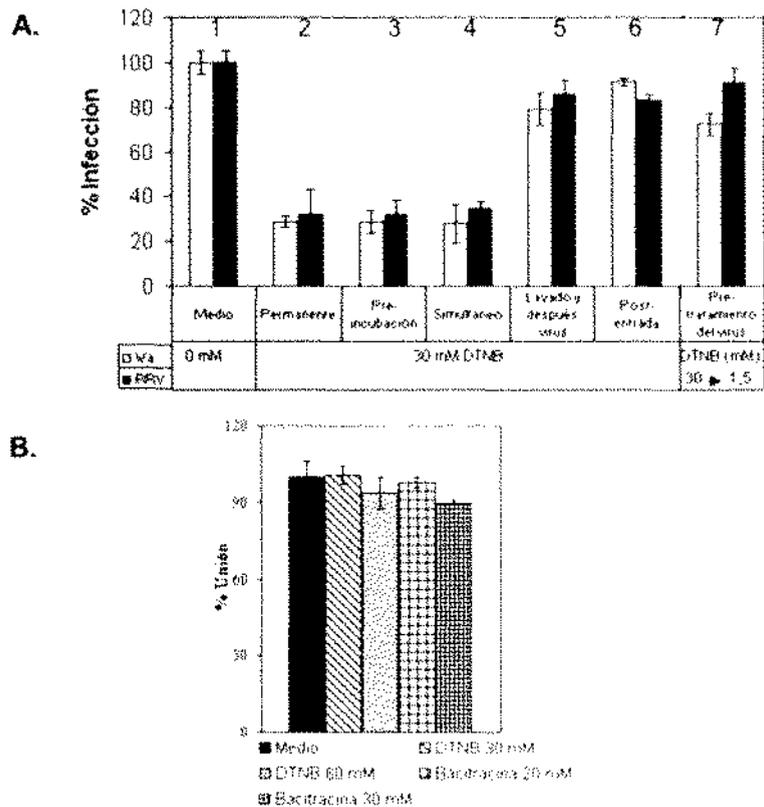


FIGURA 3. Efecto del DTNB en las diferentes etapas del proceso infectivo del rotavirus RRV y Wa en células MA104. En A, inmunocitoquímica de células infectadas con rotavirus Wa y RRV. (1) Infección sin inhibidor; (2) El proceso de infección se incubó permanentemente con DTNB; (3) se pre-incubó las células con DTNB por 30 minutos antes del reto; (4) se adicionó el virus y el DTNB simultáneamente, (5) se pre-incubó las células con el DTNB por 30 minutos y se retiró por lavados, después las células fueron retadas con el virus; (6) el DTNB se adicionó 1 h después de iniciado el proceso de internalización o post-adherencia y (7) el virus concentrado fue pretratado con 30 mM de DTNB, luego diluido hasta la concentración de trabajo y el DTNB hasta 1.5 mM. En B, unión a 4°C de rotavirus RRV a las células en presencia y ausencia de DTNB o bacitracina. El virus unido se cuantificó mediante ELISA de captura, capturando los antígenos con anticuerpo anti-rotavirus hecho en cabra y detectando con anti-rotavirus hecho en conejo con el sistema peroxidasa-OPD. El 100% de unión delta de absorbancia corresponde al delta de absorbancia de la sustracción de la absorbancia de células lisadas en ausencia de inhibidor y células sin virus.

de una reacción inespecífica (Fig. 5A). Anticuerpos contra calnexina ("chaperona" que actúa en el RE) presentaron un perfil similar de inespecificidad, pero con menor capacidad inhibitoria que para el caso de los anticuerpos dirigidos contra ERp57 (Fig. 5A). Los anticuerpos anti-calregulina mostraron un efecto similar al de los anticuerpos anti-PDI pero con una afinidad promedio tres veces menor (Fig. 5A). En el caso de la cepa Wa, los perfiles de inhibición producidos por los anticuerpos ensayados fueron similares a los descritos para la cepa RRV, excepto que los anticuerpos anti-calregulina produjeron un efecto indistinguible de aquel presentado por los anticuerpos anti-PDI (Fig. 5B).

La proteína disulfuro isomerasa (PDI) se encuentra en la membrana de células permisivas a la

infección por rotavirus, asociada a los microdominios lipídicos "rafts".

El carácter de proteína de superficie de la PDI en las células MA104 y Caco-2 fue analizada por inmunofluorescencia sobre monocapas celulares no permeabilizadas, señalando un perfil positivo aunque de baja intensidad (Fig. 6A). La citometría de flujo de células en suspensión refleja que solo el 1.7% de la población presenta reactividad hacia el anticuerpo monoclonal anti-PDI (Fig. 6B). Para confirmar la presencia de PDI asociada a la membrana celular se marcaron las proteínas superficiales con el reactivo sulfo-NHS-SS-biotin, que adiciona reversiblemente una molécula de biotina a los grupos amino libres de las proteínas, en este caso a las proteínas asociadas a la membrana celular. El lisado celular fue analizado

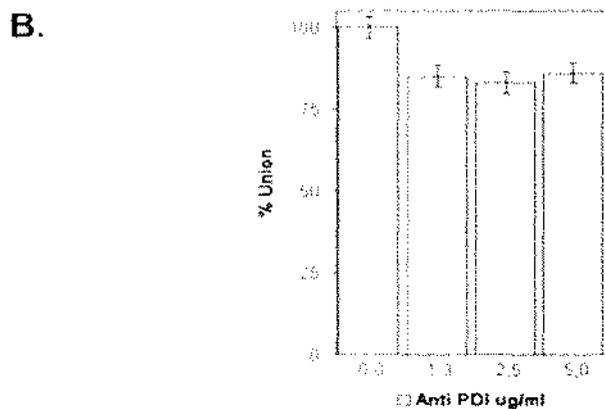
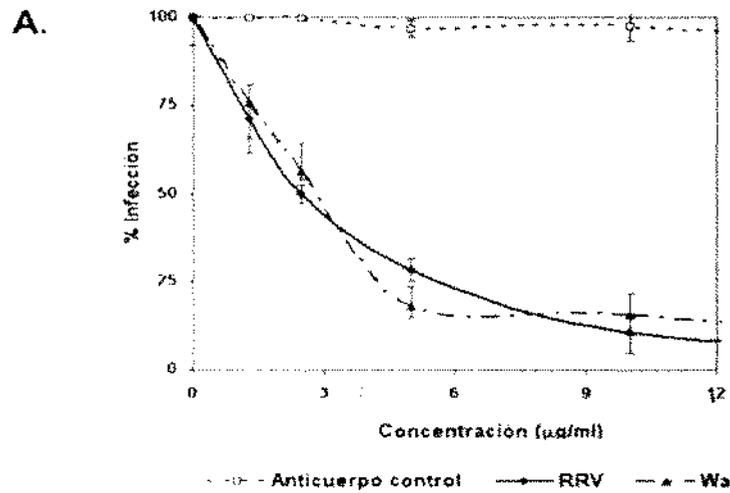


FIGURA 4. Disminución en la infección por rotavirus RRV y Wa en células MA104 con Anti-PDI en un paso post-unión. En A, las células se incubaron en ausencia y presencia del anticuerpo durante 30 minutos y luego se desafiaron con el rotavirus, la infección se dejó por 12h. El número de UFF se determinaron mediante inmunocitoquímica. En B, Unión a 4°C de rotavirus RRV a las células en presencia y ausencia del Anti-PDI. El virus unido se cuantificó mediante ELISA de captura, capturando los antígenos con anticuerpo anti-rotavirus hecho en cabra y detectando con anti-rotavirus hecho en conejo con el sistema peroxidasa-OPD. El 100% de unión delta de absorbancia corresponde al delta de absorbancia de la sustracción de la absorbancia de células lisadas en ausencia de inhibidor y células sin virus.

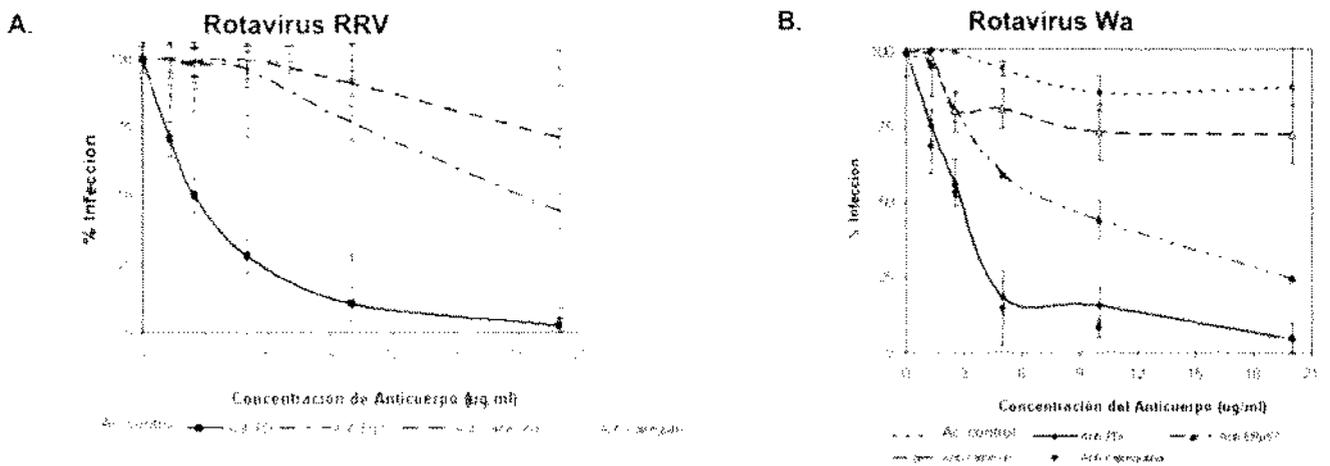


FIGURA 5. Disminución en la infección por rotavirus RRV (A) y Wa (B) en células MA104 con anticuerpos dirigidos contra diferentes chaperonas. Las células se incubaron en ausencia y presencia del anticuerpo durante 30 minutos y luego se desafiaron con el rotavirus, la infección se dejó por 12h. El número de UFF se determinaron mediante inmunocitoquímica con el sistema peroxidasa-aminocarbazo.

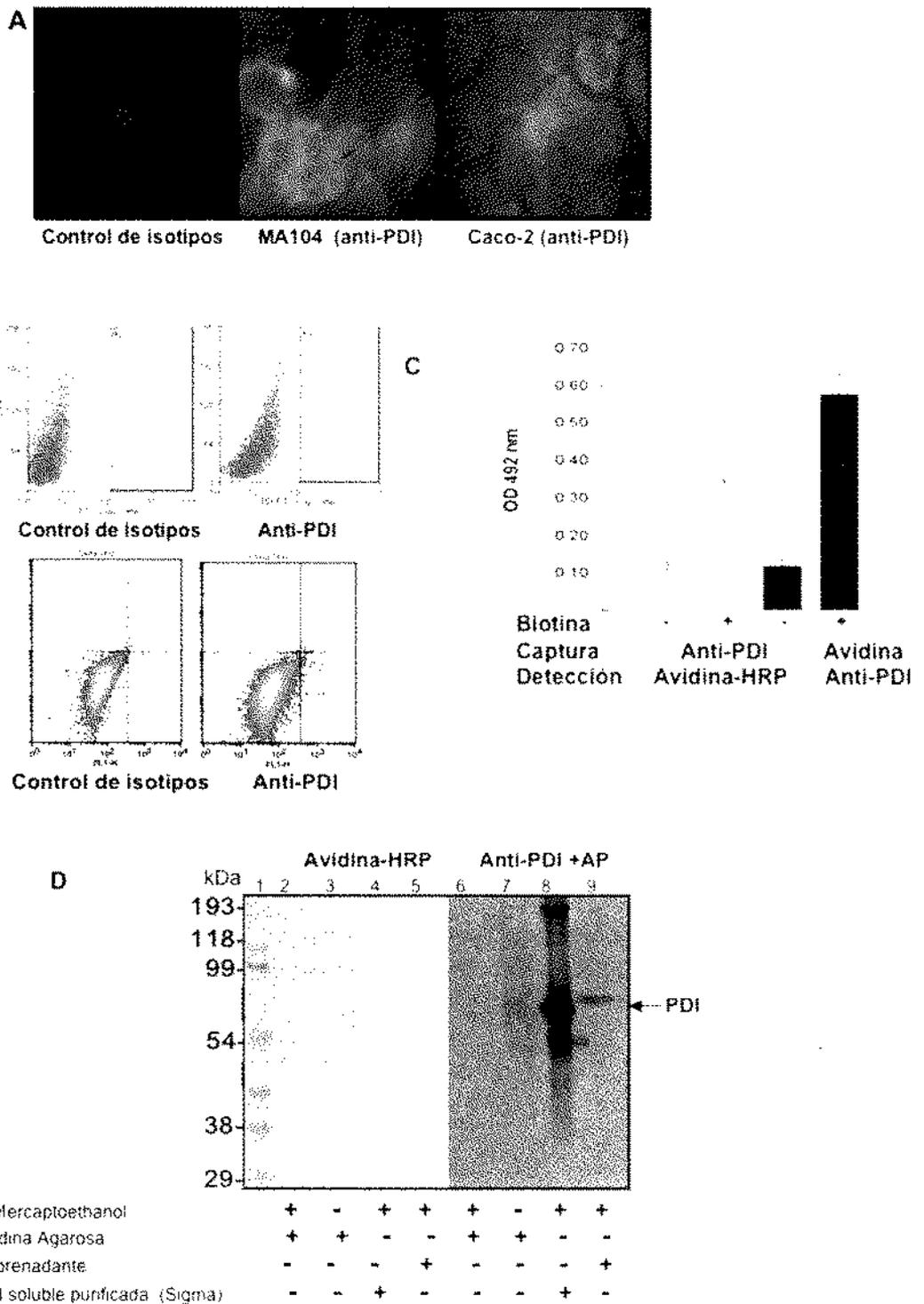


FIGURA 6. Detección de PDI en la membrana celular. A. Inmunofluorescencia indirecta no permeable sobre células MA104 y Caco-2, usando anticuerpo monoclonal anti-PDI a 10 µg/ml y anti-ratón FITC 0,7 µg/ml. B. Citometría de Flujo, marcate de las células Caco-2 y MA104 en suspensión, con anticuerpo primario anti-PDI a 50 ug/ml, anticuerpo secundario anti-ratón FITC 0,7 ug/ml. C y D Biotinilación reversible de las proteínas superficiales de células MA104; las células fueron marcadas con el reactivo sulfo-NHS-SS-Biotin y lisadas. Una fracción del lisado celular biotinilado fue analizado por ELISA de captura utilizando alternativamente anticuerpos anti-PDI generados en conejo o proteína avidina para capturar los antígenos, la detección de éstos se hizo con avidina-HRP y anticuerpos anti-PDI respectivamente. C. Las proteínas biotiniladas de la otra fracción del lisado celular se aislaron con agarosa-avidina. Las proteínas inmovilizadas y aquellas del sobrenadante se separaron mediante electroforesis denaturante bajo condiciones reductoras y no reductoras. El corrido electroforético se transfirió a una membrana de PVDF y el Western blot se analizó con avidina-HRP y anticuerpos anti-PDI.

mediante ELISA de captura usando alternativamente anticuerpos anti-PDI generados en cabra y la proteína avidina; para la detección se utilizó avidina-HRP, y anti-PDI generado en conejo, respectivamente. Este ensayo mostró que el lisado celular contiene PDI biotinilada que está presente en las proteínas asociadas a la membrana celular accesibles de ser marcadas (Fig 6C). Al lisado celular se le adicionó Avidina-agarosa con el objeto de separar las proteínas que incorporaron el sulfo-NHS-SS-biotin. Tanto las proteínas aisladas con avidina-agarosa como el sobrenadante (aquellas no enlazadas por la avidina) fueron analizadas en un gel de electroforesis en presencia y ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol (2-ME). Inmediatamente este gel fue analizado por "Western blotting".

Se detectó un perfil continuo de proteínas que reaccionan con avidina-HRP en las muestras que contenían las proteínas celulares marcadas con biotina e inmovilizadas con avidina-agarosa, cuando éstas fueron analizadas en ausencia del reductor 2-ME (Fig. 6D). Este patrón de proteínas biotiniladas se perdió cuando las proteínas inmovilizadas se trataron con 2-ME (Fig. 6D), indicando que la unión de la biotina ha sido revertida por la acción del reductor. Cuando se analiza la fracción proteica del lisado no inmovilizado (sobrenadante), no se detectó interacción con avidina-HRP, indicando la ausencia de biotina en las proteínas analizadas (Fig. 6D). Esta misma membrana del "Western blotting" se analizó con anticuerpos anti-PDI y el sistema fosfatasa alcalina (AP); se observaron bandas de interacción a la altura del peso molecular de la PDI mostrando las formas reducida y oxidada de la proteína (Fig. 6D). En el sobrenadante no biotinilado, que contiene la fracción citoplasmática, el anticuerpo anti-PDI detectó una banda mas intensa respecto a la banda separada con avidina (Fig. 6D).

Estos resultados junto con los encontrados por las técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia concuerdan con lo ya reportado acerca de la baja concentración de PDI en la membrana celular.

Se ha reportado que proteínas receptoras para rotavirus, como la Hsc70 y la integrina $\beta 3$, se encuentran en los microdominios lipídicos "rafts" (Pavel et al., 2004), por ello se decidió explorar la posibilidad de que PDI estuviera asociada a los "rafts". Para esto las fracciones de lisados celulares enriquecidas en membranas, separadas por gradientes de sacarosa y tratadas, como se describió en Materiales y Méto-

dos para deshacer los "rafts", fueron analizadas por "Western blotting" y ELISA de captura.

Mediante "Western blotting" se encontró a PDI y la proteína Hsc70 en las fracciones de menor densidad, correspondientes a aquellas enriquecidas en membranas que incluyen los microdominios lipídicos "rafts"; también se detectaron estas proteínas en las fracciones del extremo de alta densidad, que corresponde a las proteínas citoplasmáticas solubles (Fig. 7A). Cuando las células se trataron con β -metilciclodextrina antes de ser lisadas y separadas en el gradiente, no se detectaron PDI y Hsc70 en las fracciones de baja densidad, lo cual es compatible con la disociación de los "rafts" ocasionada por el tratamiento previo con β -metilciclodextrina (Fig. 7B).

Para determinar si en estas condiciones experimentales PDI está unida por interacción proteína-proteína a moléculas receptoras como la Hsc70 y la $\beta 3$, los lípidos de cada fracción del gradiente de sacarosa fueron solubilizados, incubando cada fracción con octilglucósido, Triton al 1% y β -ciclodextrina. Posteriormente, cada fracción se sometió a inmunoprecipitación con anti-PDI; se encontró que PDI co-inmunoprecipita con Hsc70 y la integrina $\beta 3$ en las fracciones del gradiente analizadas (Fig. 7C). Estos resultados se confirmaron mediante ELISA de captura, determinándose nuevamente interacciones que implicaban PDI, Hsc70 e integrina $\beta 3$ (Fig. 7D). El reconocimiento de los anticuerpos específicos anti-ERp57 no presentó afinidad significativa por los componentes del complejo examinado.

En conjunto, los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de inmunodetección y marcaje, indican la presencia en muy baja concentración de la proteína PDI asociada a la membrana celular en células MA104 y Caco-2; haciendo parte de los microdominios lipídicos "rafts" y formando complejos con las proteínas Hsc70 e integrina $\beta 3$, utilizadas como receptores por las proteínas VP7 y VP4 del rotavirus en el proceso de internalización.

Interacción rotavirus - PDI

Para determinar si existe interacción entre PDI y el rotavirus, se realizó un ensayo de unión entre PDI soluble y TLPs de la cepa RRV y Wa. La presencia del complejo proteico rotavirus-PDI se estableció mediante "Western blotting" y ELISA de captura. El análisis por "SDS-PAGE/Western blotting" de la mezcla PDI-

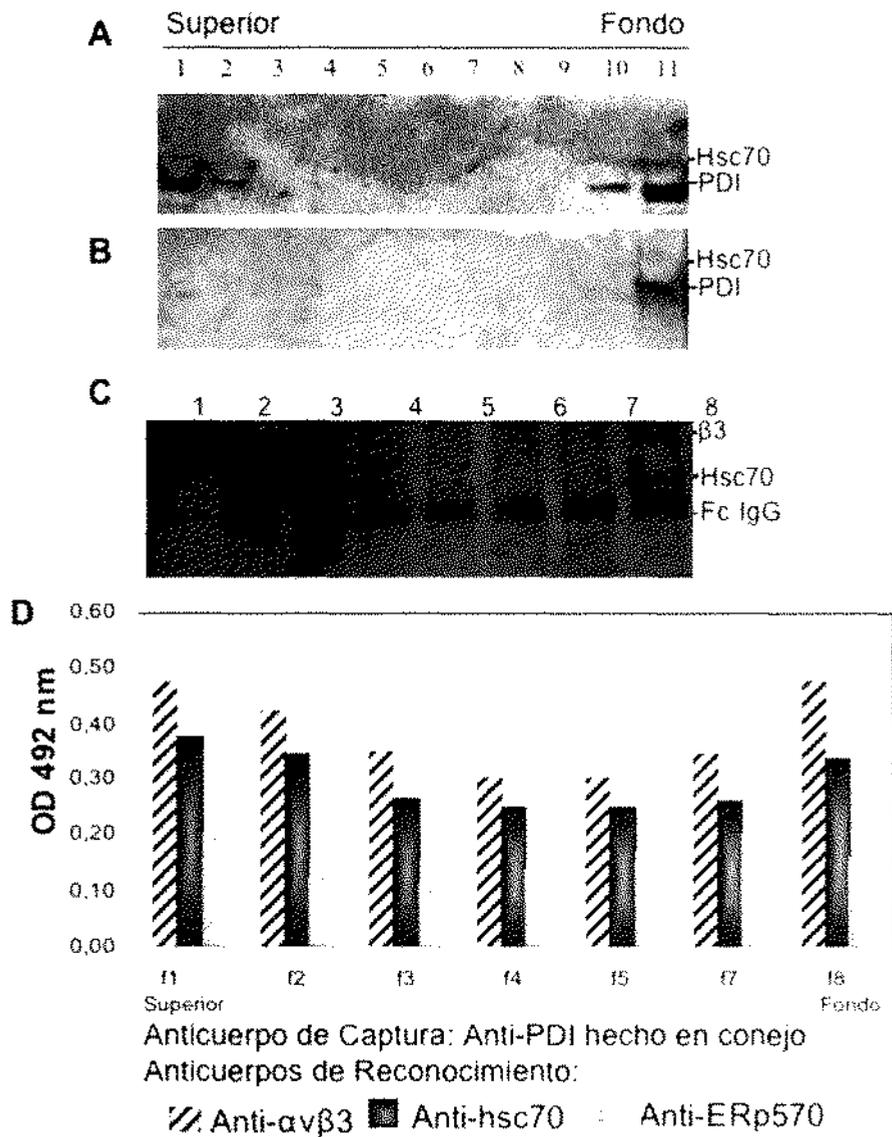


FIGURA 7. PDI está presente en los microdominios lipídicos Rafts. En A, células MA104 lisadas a 4°C con buffer Tris-NaCl, TritónX100 1% y centrifugadas en un gradiente de sacarosa (5-40%). En B, como control, células tratadas con β -meliliclodextrina 10mM antes de lisarlas. Las fracciones recuperadas del gradiente fueron tratadas con octil-glucósido 0,2%, β -meliliclodextrina 10mM, con incubación 1h a 37°C. 30 μ l de cada fracción fue separada por SDS-PAGE, transferidas a membrana PVDF y ésta revelada con anticuerpos Anti-PDI y Anti-Hsc70, y el sistema fosfatasa alcalina-NBT/BCIP. En C, las fracciones se inmunoprecipitaron con Anti-PDI, se separaron por SDS-PAGE, fueron transferidas a membrana de PVDF, la membrana se reveló con anticuerpos contra las proteínas Hsc70 e integrina β 3, y peroxidasa-luminol. En D, ELISA de captura con Anti-PDI de cada una de las fracciones, las proteínas se detectaron con Anti-Hsc70, Anti-Integrina β 3 y Anti-ERp57, la placa fue revelada con el sistema peroxidasa-OPD. El delta de absorbancia es la diferencia después de restar el promedio de los pozos sin antígeno.

TLPs de RRV que fue precipitada a través del colchón de sacarosa por centrifugación a 133.000 x g, muestra a PDI junto con las TLPs. Este resultado sugiere que existe una interacción entre las TLPs y la PDI, dado que la presencia de PDI en el precipitado del fondo del tubo solo es posible si se encuentra asociada a las partículas virales, las cuales poseen un coeficiente de sedimentación que explica su transporte hasta el

fondo del tubo en las condiciones de centrifugación utilizadas en este experimento.

La PDI aislada, tiene un coeficiente de sedimentación mucho mas bajo que el de las TLPs, el cual no le permitiría sedimentar a través del colchón de sacarosa sometido al campo centrifugo aplicado (Fig. 8A). Mediante ELISA de captura se encontró a PDI en interacción con las TLPs cuando se utilizó alter-

nativamente anti-PDI y anti-rotavirus para capturar los complejos proteicos (Fig. 8B). Esta interacción disminuyó cuando la reacción se hizo en presencia de DTNB (Fig. 8C), sugiriendo que en dicha interacción puede estar interviniendo el motivo catalítico redox de la PDI, sin descartar alguna interacción de tipo chaperona. Las células Caco-2 se marcaron en sulfo-NHS-SS-biotin, como se describió anteriormente para las células MA104, se adicionó virus Wa y se incubó por 40 minutos a 4°C, se dejaron 15 minutos más a temperatura ambiente y luego se lisaron las células. Al lisado celular se le adicionó Avidina-agarosa con el objeto de separar las proteínas que incorporaron el sulfo-NHS-SS-biotin; las proteínas aisladas con avidina-agarosa fueron analizadas por "Western blotting" (Fig. 8D). Los resultados señalan la presencia de PDI superficial, la cual fue marcada con biotina, aislada con avidina-agarosa y detectada con avidina-HRP y anticuerpos anti-PDI. Además PDI estaría interactuando con el rotavirus Wa, ya que se detectó al menos una proteína de éste cuando la misma membrana fue revelada con anticuerpos anti-rotavirus y el conjugado de fosfatasa-alcalina (Fig. 8D).

Para determinar la existencia de grupos tioles libres en el complejo PDI-rotavirus, se utilizó EZ-link Maleimide PEO2-Biotin, un reactivo que forma un enlace tioeter con los grupos tioles libres, esta reacción es medible por la incorporación de biotina. El EZ-link Maleimide PEO2-Biotin se adicionó simultáneamente con el virus a las células en presencia y ausencia de DTNB. El lisado celular se examinó en ELISA, capturando los respectivos antígenos con anti-rotavirus (Fig. 9A) o con anti-PDI (Fig. 9B), seguido de la detección con los anticuerpos recíprocos correspondientes, los resultados nuevamente reafirman la interacción entre la PDI y el rotavirus.

La incorporación de biotina fue medida cuando los antígenos se detectaron con avidina-HRP. Se observan diferencias en la cantidad de biotina incorporada por los complejos proteicos PDI-rotavirus en presencia o ausencia de DTNB; la presencia de este inhibidor redujo la incorporación de biotina, debido a una menor disponibilidad de grupos tioles. Este ensayo muestra que hubo incorporación de biotina sobre el complejo proteico rotavirus-PDI, indicando la presencia de proteínas con cisteínas accesibles a la alquilación dentro del complejo que incluye a PDI y al rotavirus.

Péptidos sintéticos con cisteínas de secuencias rotavirales inhiben la infección en células MA104

Para realizar una aproximación a la implicación de las proteínas del rotavirus como sustratos del intercambio tiol/disulfu posiblemente catalizado por la PDI, se sintetizaron péptidos sintéticos de los rotavirus RRV y Wa, correspondientes a secuencias de las proteínas VP7 y VP4 que contienen cisteínas. Las secuencias seleccionadas incluyeron la región constituida por los aminoácidos 200-219 de VP4, las regiones 189-210 y 243-264 de la proteína VP7 de las cepas RRV y Wa. Como controles se sintetizaron péptidos no relacionados con rotavirus y aquellos rotavirales en los que se sustituyó la cisteína por serina, además de los péptidos con la secuencia de aminoácidos al azar con y sin cisteínas (Tabla 1).

Se evaluó la infección de rotavirus RRV en células MA104 en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos mediante inmunocitoquímica midiendo las UFF. Recientemente se ha reportado que los rotavirus interactúan con la integrina $\alpha\beta 3$ a través de la región 161-169 de la proteína VP7, región peptídica llamada CNP (Péptido 12 o P12 de la Tabla 1); esta secuencia en VP7 es altamente conservada entre las diferentes cepas de rotavirus y bloquea eficientemente la infección de la cepa RRV mas no la unión a la célula (Zarate et al., 2004); este péptido fue utilizado como control positivo de inhibición. La disminución en el porcentaje de infección para el P12 es dosis dependiente, el 50% de inhibición se logró a una concentración 1,5 mM de péptido. Tanto el péptido original, P12, como su versión modificada de Cys por Ser (P13), inhiben la infección por rotavirus con un perfil similar (Fig. 10A), indicando para este caso poca relevancia de ese aminoácido cisteína en el proceso infeccioso.

La secuencia de la proteína VP8 (200-219) de la cepa RRV, P8, tiene un efecto inhibitorio de la infección rotaviral dependiente de la concentración, se inhibió el 50% de la infección con una concentración de 0.34 mM de péptido (Fig. 10B). Para el caso de la versión modificada el P9 aunque tuvo un comportamiento similar de inhibición dependiente de la concentración, el 50% inhibitorio se logró a una concentración de 0.8 mM, esto podría reflejar una mayor afinidad del P8 por la molécula receptora en la célula.

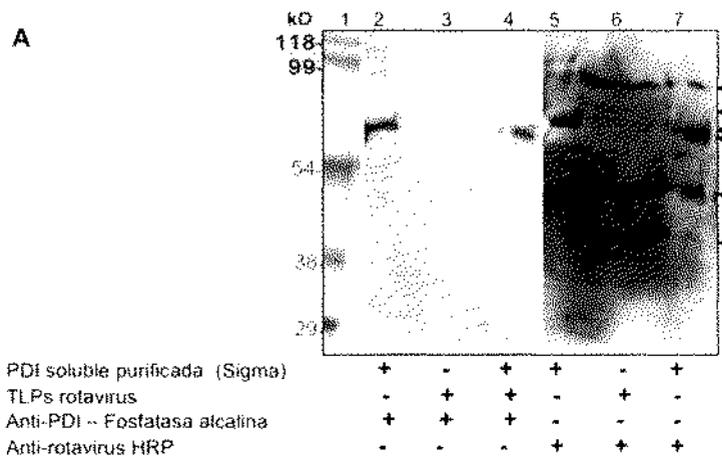


FIGURA 8A. Interacción entre PDI y TLPs de RRV. A. Western blot de 3 µg de PDI con 1 µg de TLPs, la mezcla se incubó por 30 min a temperatura ambiente, luego se colocó sobre un colchón de sacarosa al 40% y se centrifugó a 133.000 x g; la membrana se reveló con anticuerpos Anti-PDI (detección con fosfatasa alcalina-NBT/BCIP) y luego con anticuerpo Anti-rotavirus (detección peroxidasa-luminol).

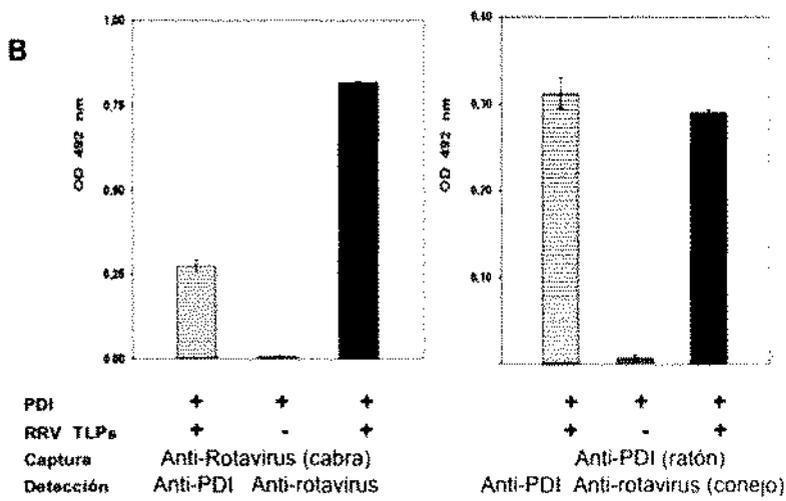


FIGURA 8 (B y C). Interacción entre PDI y TLPs de RRV. En B, las TLPs se mezclaron con 4 µg de PDI soluble (bovina-Sigma) por 30 min a 20°C, el complejo se adicionó sobre una placa de ELISA sensibilizada con anti-rotavirus generado en cabra y detectada con anti-rotavirus o anti-PDI generados en conejo. El delta corresponde a sustracción de la absorbancia del control consistente de células lisadas sin virus, o PDI sin virus. En C, diferentes concentraciones de PDI se adicionaron al virus, en presencia y ausencia de DTNB, siguiendo el procedimiento anterior.

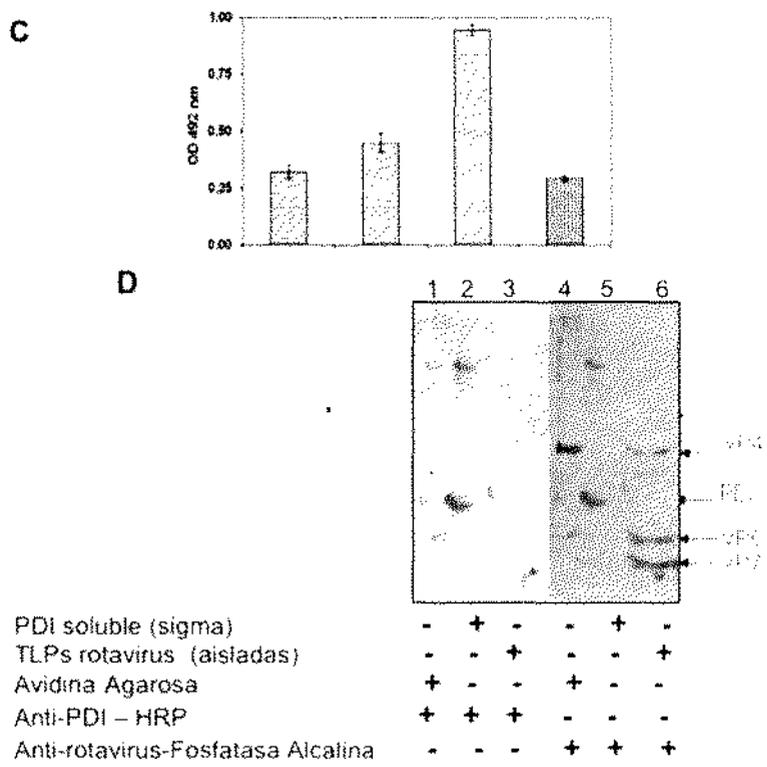


FIGURA 8D. Interacción entre PDI y TLPs de RRV. Células Caco-2 fueron marcadas con sulfo-NHS-SS-Biotin, se adicionó rotavirus Wa por 40 min a 4 °C y 15 min a 20 °C. Las células fueron lisadas y las proteínas biotiniladas inmovilizadas con agarosa-avidina. Las proteínas inmovilizadas se analizaron por "Western blotting" con avidina-HRP y anticuerpos anti-PDI, para detectar PDI y con anti-rotavirus para detectar las proteínas virales.

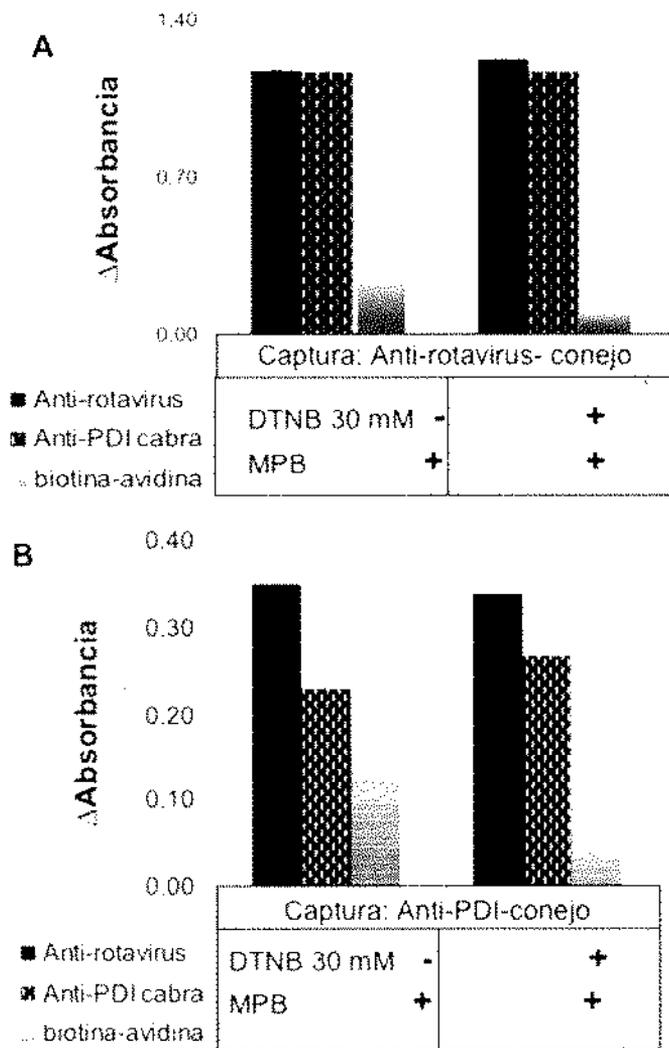


FIGURA 9. El complejo Rotavirus-PDI tiene cisteínas accesibles de alquilación. Las células MA104 recibieron simultáneamente el rotavirus RRV y EZ-link Maleimide PEO2-Biotin para alquilar los grupos tioles libres en presencia y ausencia de DTNB durante 30 min a 20°C, se adicionó glutatión reducido y se retiró por lavado el virus y los reactivos solubles. El lisado celular se adicionó a una placa de ELISA, preincubada con anti-rotavirus (A), o anti-PDI (B) hechos en conejo y se reveló con anti-rotavirus o anti-PDI generados en cabra para detectar los antígenos proteicos y con avidina-HRP para evaluar la incorporación de biotina.

Al parecer estos dos péptidos son de mayor afinidad al ser comparados con el P12, cuya concentración inhibitoria al 50% fue 4.4 veces mayor que la encontrada para P8. Al aumentar la concentración de los péptidos P8 y P9 hasta 1.7 mM se logra un porcentaje de inhibición del 90%; sin embargo el perfil observado a esas concentraciones para los péptidos; sin embargo el perfil de inhibición de P9 no es saturable correspondiente a aquellos que se describen

como de baja especificidad (Fig. 10B). El efecto de péptidos sintéticos de secuencias no relevantes de rotavirus no produjo inhibición de la infección, sin embargo el P10, un péptido con un contenido de aminoácidos igual al de P8 pero organizados al azar, tuvo un efecto inhibitorio de menor afinidad, alcanzándose el 50% solo hasta 1,2 mM (Fig. 10B).

Anticuerpos generados en conejo contra el P8 fueron capaces de reducir la infectividad por rotavirus en un 90% con un perfil de saturación. Esto se logró cuando los anticuerpos fueron adicionados al complejo células-virus, después del proceso de adherencia del virus a 4°C. Cuando el anticuerpo anti-péptido P8 es incubado con el virus y luego esta mezcla adicionada a las células, la inhibición es del 70%, comparados contra el 100% de infección mostrado por el suero preinmune (10C). Este anti-péptido no afecta el proceso de adherencia del virus a la célula según indican los resultados de unión rotavirus-células medido por ELISA de captura (Fig. 10D). El comportamiento del anticuerpo anti-péptido P8 frente a la infección rotaviral, apoya los resultados encontrados de inhibición de la infección con el péptido P8, también sugieren un efecto neutralizante de este anti-péptido sobre las partículas virales. El anticuerpo anti-P8 reconoció tanto al P8 como a la versión modificada P9, más no a la versión desordenada P10; sin embargo, el péptido P8, al igual que el P9 y el P10 no fueron reconocidos por los anticuerpos anti-rotavirus generados en un conejo inoculado con las TLPs (Fig. 10E).

Para determinar la posible interacción entre los péptidos derivados de VP4 y PDI, tanto el péptido como la enzima se mezclaron, la interacción fue analizada en un sistema de ELISA de captura, capturando los antígenos alternativamente con anti-PDI (de ratón) o anti-péptido P8, y detectando la interacción con el anticuerpo recíproco, respectivamente.

Se determinó una fuerte interacción entre el péptido P8 y PDI, la cual disminuyó cuatro veces al cambiar en el péptido las cisteínas por serinas (Fig. 11A), en el que se muestra además el bajo reconocimiento hacia el complejo PDI-P17, por parte de los anticuerpos anti-PDI y anti-péptido P17, siendo este un péptido de secuencia sin cisteínas y no relacionada con rotavirus. Para confirmar la especificidad de la interacción PDI-VP8 mediada por el péptido P8, se realizó un ensayo de competencia medido por ELISA de captura, en el cual se capturaron los antígenos rotavirales y se detectó PDI en interacción con las TLPs de RRV, en

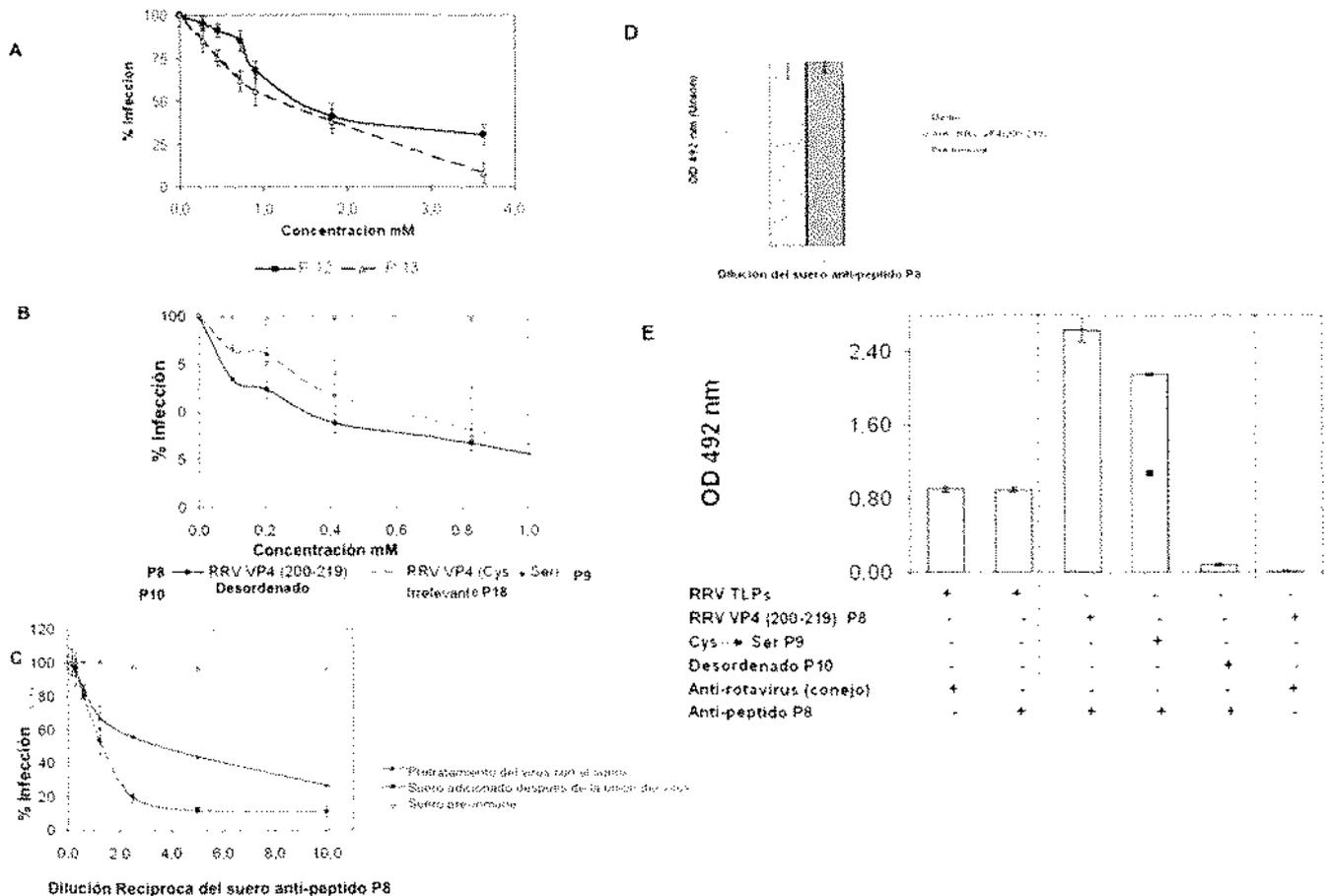


FIGURA 10. Infección de virus RRV a Células MAT104 en presencia y ausencia de péptidos rotavirales, modificados y no rotavirales: A. Péptido CNP (P12) de VP7 (161-169) de unión a Integrina $\alpha v\beta 3$ y la versión modificada P13 (Cys x Ser). B. Péptido de RRV VP4 (200-219) (o igualmente VP8 200-219); la versión modificada P9, la versión de secuencia al azar del original (P10) y la versión al azar del modificado (P18). Las monocapas fueron infectadas por rotavirus MOI 1:0,5 en las concentraciones indicadas de péptido. El porcentaje de infección se midió cuantificando el virus como unidades formadoras de foco (UFF) mediante inmunocitoquímica con anti-rotavirus hecho en conejo y el sistema peroxidasa. C. Inmunocitoquímica del tratamiento de las células con el anticuerpo anti-péptido P8 en el proceso infectivo con rotavirus RRV. D. Unión a 4°C de rotavirus RRV a las células en presencia y ausencia del suero del anti-peptido P8. El virus unido se cuantificó mediante ELISA de captura. E. Reconocimiento específico del anticuerpo anti-P8 hacia los péptidos P8, P9 y P10, y hacia las TLPs de RRV; así como también reconocimiento específico del anti-rotavirus hacia los péptidos. Todo medido mediante ELISA y el sistema peroxidasa-OPD.

presencia de diferentes concentraciones de péptido P8. Los resultados de este ensayo mostraron que a medida que aumenta la concentración de P8 hay menor detección de PDI. Estos resultados sugieren que el rotavirus RRV interacciona con PDI mediante la secuencia de VP8 (200-219) (Fig 11B).

De la proteína VP7 se seleccionaron dos regiones que contienen cisteínas en sus secuencias, y que corresponden a los aminoácidos 189-210 y 243-264. La secuencia peptídica de VP7 189-210 (P6) incluye 3 cisteínas (Cys) y una versión truncada de esta secuencia ubicada entre los aminoácidos 192 y 210 (P4) y que posee solo 2 cisteínas (Cys). Se

estudiaron también las versiones modificadas mediante el cambio de cisteína por serina (Cys x Ser), correspondientes respectivamente a los péptidos P7 y P5 (Tabla 1). Los resultados indican que al adicionar los péptidos a la célula, a una concentración de 2 mM y luego infectarlas, hay inhibiciones de la infección rotaviral hasta en un 70%, con tendencia a un perfil de saturación. Para alcanzar el 50% de inhibición de la infección se requirió de una concentración de 1.26 mM para el péptido P4 y de 1.09 mM para el péptido P6. Hay un efecto importante de las cisteínas en la interacción con el (los) receptor(es), ya que al analizar las respectivas versiones modificadas (Cys

x Ser) el 50% de inhibición de la infección se obtiene prácticamente con el doble de la concentración de péptido original (Fig. 12A).

Anticuerpos generados en conejo contra el péptido P6 fueron capaces de reducir la infectividad del rotavirus en un 90% cuando los anticuerpos fueron adicionados después del proceso de unión (adherencia) del virus a las células a 4°C. Cuando los anti-P6 son incubados con el virus y luego esta es mezcla adicionada a las células, el perfil de la curva de inhibición de la infección no es saturable, con un valor de 60% a la máxima concentración de anticuerpos utilizada (Fig. 12B). Los anticuerpos anti-P6 no afectan el proceso de adherencia del virus a la célula a 4°C, según indican los resultados de unión rotavirus-células obtenidos por ELISA de captura (Fig. 12C).

Los resultados de inhibición de la infección rotaviral con los anticuerpos anti-P6, apoyan los datos obtenidos con los péptidos P4 y P6 con relación a la infección por rotavirus. Los anticuerpos anti-P6 no presentan un efecto neutralizante sobre las partículas virales antes de su unión a la superficie; mientras que

el efecto inhibitorio de estos anticuerpos sólo se expresa cuando son añadidos en un momento posterior a la unión (adherencia) del virus a la célula. Además, no se detectó un apreciable reconocimiento de los anticuerpos anti-P6 hacia las TLPs de la cepa RRV, de acuerdo con las determinaciones realizadas con ELISA (Fig. 12D). Estos resultados, en conjunto, sugieren que el virus requiere de cambios conformacionales que impliquen la exposición la región 189-210 de VP7 para ser utilizada en las interacciones subsecuentes del virus con las moléculas de superficie de la célula. Los anticuerpos anti-P6 reconocieron los péptidos P4, P6 y en menor medida a los péptidos modificados P5 y P7, mientras que ninguno de estos péptidos fue reconocido por los anticuerpos anti-rotavirus generados en un conejo inoculado con TLPs (Fig. 12D).

Para determinar la posible interacción entre la PDI y los péptidos derivados de VP7, las dos entidades se mezclaron en una proporción 4 a 1 (PDI: péptido) en términos μg . La interacción fue analizada en un sistema de ELISA de captura, capturando los antígenos alternativamente con anticuerpos anti-PDI o anti-péptido P6, y detectando la interacción

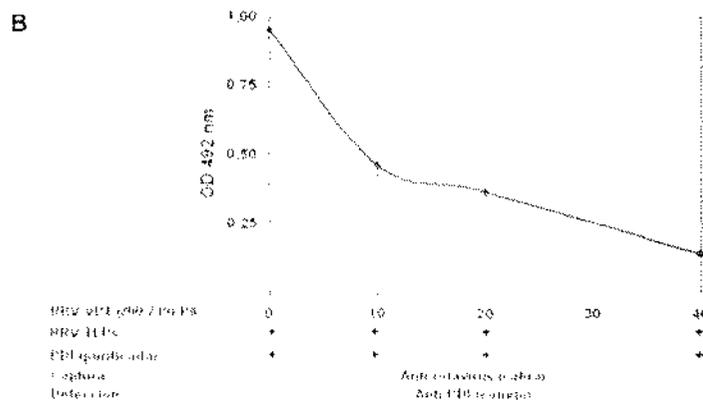
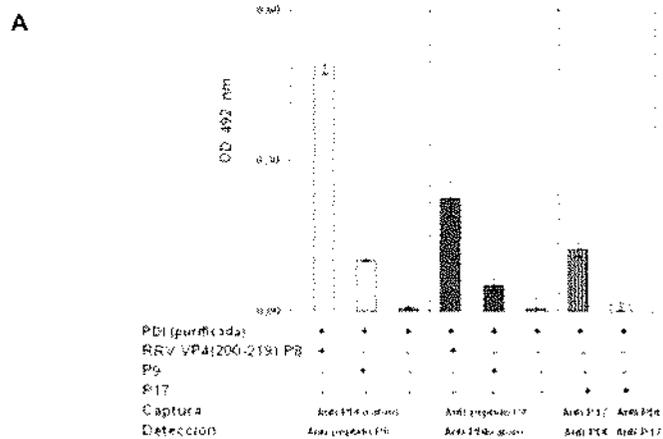
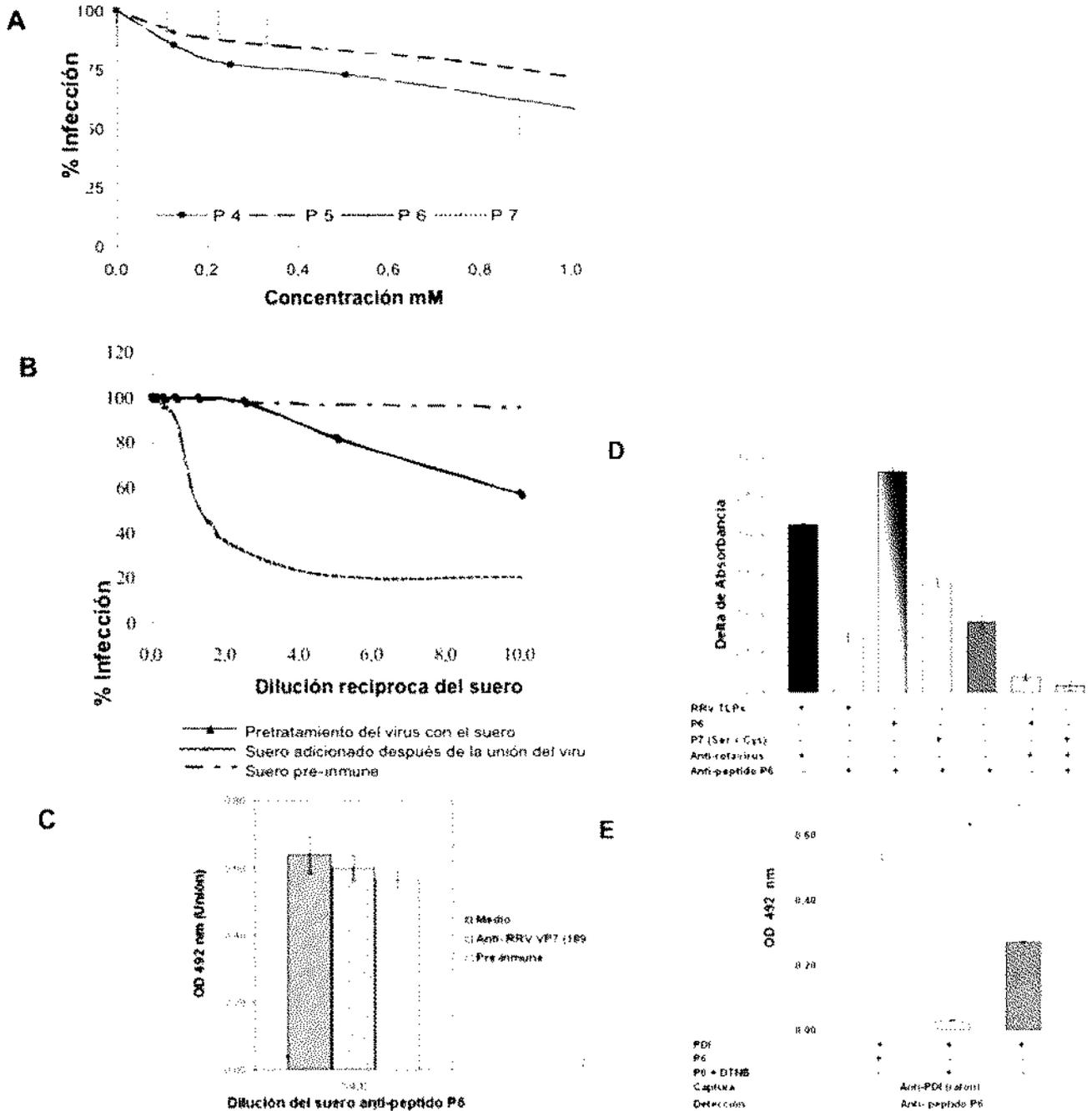


FIGURA 11A. Interacción PDI con los Peptidos P8, P9, P17. PDI (4 μg) se mezcló con los péptidos en relación 4 a 1, la interacción fue analizada por ELISA de captura. B. Ensayo de competencia entre el P8 y el rotavirus por PDI. Diferentes cantidades (μg) de PDI se incubaron con el P8 y se adicionó el virus y se detectó PDI, mediante ELISA de captura, con el sistema peroxidasa-OPD.

similares a los obtenidos en ausencia del inhibidor, lo que sugiere que el estatus reductor de la membrana es rápidamente alcanzado siendo el rotavirus sensible a la interacción las proteínas de actividad tiol-disulfuro.

con estos mismos anticuerpos en forma reciproca. Los resultados muestran una apreciable interacción de los péptidos que contienen cisteínas con PDI, interacción que es minimizada cuando la reacción se hace en presencia de DTNB o con los péptidos



modificados por cambio de las cisteínas por serinas (Fig. 12E). Estos resultados sugieren que el rotavirus interacciona con PDI involucrando el sitio catalítico redox de PDI.

La segunda región de VP7 estudiada corresponde a la secuencia de aminoácidos 243-264, cuyo péptido original (P1) incluye la secuencia de aminoácidos GPR que constituye el ligando de unión a la integrina $\alpha\beta 2$ (Coulson et al., 1997). Los aminoácidos glicina y arginina fueron reemplazados en el péptido P2 por alanina y leucina respectivamente, se sintetizó también el péptido modificado en el que se cambiaron las cisteínas por serinas, asignado como el péptido P3. Cuando las células se infectaron con rotavirus en presencia de concentraciones crecientes de estos péptidos, se observó inhibición de la infección de manera dosis dependiente hasta del 85%, con un perfil de saturación a partir de 0.25 mM para el péptido P2 (Fig. 13A). Existe una apreciable diferencia de comportamiento frente a la infección mediada por los péptidos P2 y P3, ya que para alcanzar el 50% de inhibición con el péptido P2 se requiere 0.18 mM de péptido, mientras que para su versión modificada Cys por Ser (P3) aumenta hasta 0.82 mM, en una relación de 4.5 veces, reflejando una disminución de la afinidad del péptido por la molécula receptora (Fig. 13A).

Los anticuerpos generados en conejo contra el péptido P2 redujeron la infectividad por rotavirus en un 90%, cuando se adicionaron al complejo células-virus. Esta inhibición ocurrió cuando se adicionó el anticuerpo después que el virus ya estaba adherido a la célula, a 4°C, en un perfil saturable. Cuando el anticuerpo anti-P2 fue incubado con el virus y esta mezcla adicionada a las células, la inhibición de la infección fue del 50% a la máxima concentración de suero analizada, en un perfil no saturable que se relaciona con un comportamiento de baja especificidad (Fig. 13B). Al igual que en los casos anteriores, estos anticuerpos contra el péptido P2 no afectan el proceso de adherencia del virus a la célula (Fig. 13C).

Los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-péptido P2 en el ensayo de inhibición de la infección, apoyan los resultados obtenidos al incubar estos péptidos con las células, en los cuales P1 y P2 compiten con el rotavirus por los receptores celulares. Al parecer, de manera similar a lo obtenido para la región de VP7 189-210, la secuencia de VP7 243-264 no estaría expuesta en la partícula viral. Esto se

deduce porque no se observa un efecto neutralizante de los anticuerpos anti-P2 sobre las TLPs, cuando los anticuerpos se incuban con las TLPs a 37 (C y luego se adicionan a la célula. Estos resultados en conjunto, sugieren que el rotavirus requiere de cambios conformacionales una vez se une a la célula, en lo denominado post-unión, para que esta región 243-264 de VP7 sea expuesta a la superficie celular y pueda utilizarse en el proceso de entrada del virus a la célula.

Los anticuerpos anti-péptido P2 reconocieron el péptido P2, y en menor medida a los péptidos P3 y P1, mientras que ninguno de estos péptidos fue reconocido por los anticuerpos anti-rotavirus generados en un conejo inoculado con TLPs (Fig. 13D). Siguiendo el esquema expuesto anteriormente de incubación de la PDI y los péptidos, analizamos si hay interacción entre PDI y estos péptidos. Los resultados muestran interacción de los péptidos P1 y P2, que contienen cisteínas, con la PDI. La interacción disminuye cuando la reacción se hace incubando PDI con el péptido modificado P3 (Cys por Ser) (Fig. 13E).

El péptido P11 corresponde a la secuencia de la proteína VP8 (213-232) de la cepa Wa. La secuencia de aminoácidos de esta región carboxiterminal presenta diferencias entre las cepas Wa y RRV. La cepa Wa tiene una serina en la posición 203, mientras que la cepa RRV (y otras cepas dependientes de ácido siálico) contiene cisteína. En la posición 216 de la VP8 hay una cisteína conservada en las diferentes cepas rotavirales. Al adicionar el péptido P11, a una concentración 1.57 mM a las células MA104, se inhibió la infección del rotavirus RRV en un 50% (Fig. 14).

Este mismo experimento se llevó a cabo con otros péptidos no rotavirales que tienen cisteínas en su secuencia. En este caso, se presentó inhibición de infección, sugiriendo que la presencia del aminoácido cisteína confiere capacidad de inhibir la infección por rotavirus. Probablemente hay inhibición porque estos péptidos, a pesar de ser secuencias no relacionadas con rotavirus, también son sustrato de la PDI (Fig. 14).

Los péptidos sin cisteínas y no relacionados con rotavirus, como el P17 y su anticuerpo, no tienen efecto alguno sobre la infección rotaviral y tampoco interaccionan con PDI. Los péptidos P18 y P19, constituidos por secuencias al azar pero compuestas por los aminoácidos de los péptidos modificados (Cys x Ser), tampoco tuvieron incidencia sobre la infección rotaviral.

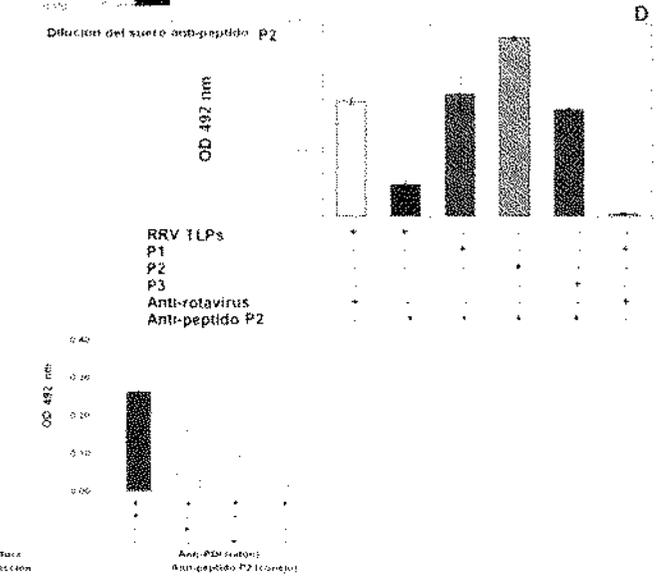
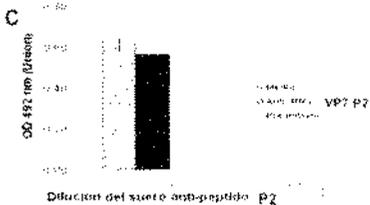
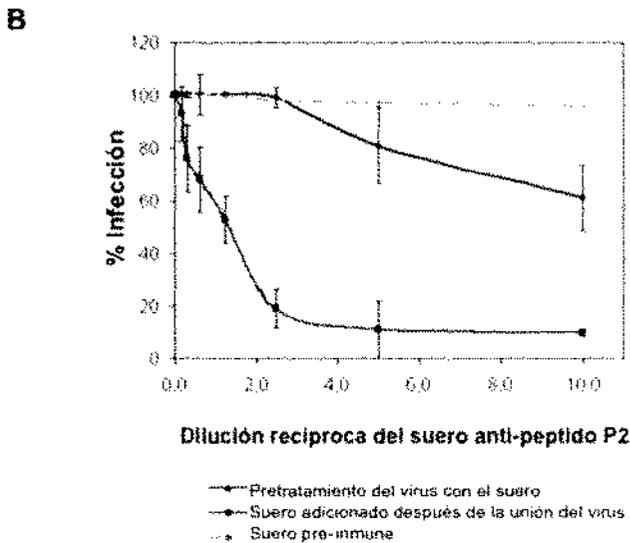
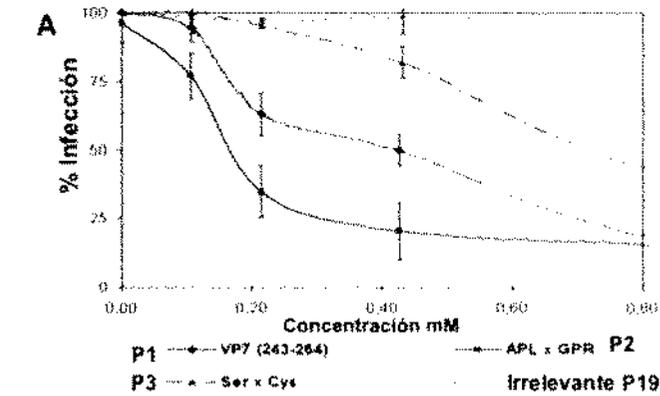


FIGURA 13 (A y B). En A, Infección de virus RRV a Células MA104 en presencia y ausencia del péptido rotaviral P2 de VP7 (243-264) y las versiones modificadas P2 y P3. Las monocapas fueron infectadas por rotavirus MOI 1:0,5 en las concentraciones indicadas de péptido. El porcentaje de infección se midió cuantificando el virus como unidades formadoras de foco (UFF) mediante inmunocitoquímica con anti-rotavirus hecho en conejo y el sistema peroxidasa. B. Inmunocitoquímica del tratamiento de las células con el anticuerpo anti-peptido P2 en el proceso infectivo con rotavirus RRV.

FIGURA 13 (C, D y E). Infección de virus RRV a Células MA104 en presencia y ausencia del péptido rotaviral P2 de VP7 (243-264) y las versiones modificadas P2 y P3. C. El virus unido a la células en presencia de anticuerpo anti-peptido P2, se cuantificó mediante ELISA de captura. D. Reconocimiento específico del anticuerpo anti-P2 hacia los péptidos P1, P2 y P3, y hacia las TLPs de RRV; así como también reconocimiento específico del anti-rotavirus hacia los péptidos. Todo medido mediante ELISA y el sistema peroxidasa- OPD. E. Interacción PDI con los péptidos P1, P2 y P3. PDI (4 µg) se mezcló con los péptidos en relación 4 a 1, la interacción fue analizada por ELISA de captura.

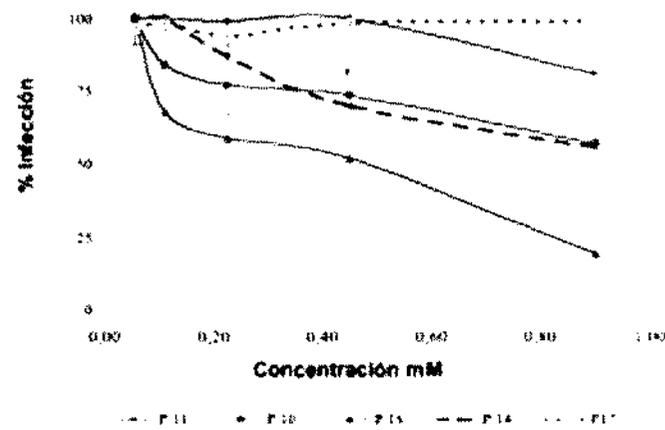


FIGURA 14. Infección de virus RRV a células MA104 en presencia y ausencia de péptidos no relacionados con rotavirus, con y sin cisteínas. Las células MA104 se incubaron con los péptidos por 30 min, luego se retaron con el rotavirus RRV y se incubaron por 12 h. La presencia del virus se evaluó por inmunocitoquímica.

Discusión

Las proteínas PDIs se han visto implicadas en importantes procesos biológicos en sitios diferentes al RE, aunque no se conoce mucho acerca de las funciones y los mecanismos de acción de las PDIs, en esos sitios. Al menos tres proteínas de esta familia en mamíferos han sido encontradas en la superficie celular, el espacio extracelular, el citosol y el núcleo (Essex et al 1995; Turano, C. 2002). A nivel de la membrana celular la PDI ha sido encontrada en diferentes células, entre ellas plaquetas activadas, hepatocitos, páncreas exocrino, células endoteliales, linfocitos CHO, BHK (Chen et al., 1992; Terada et al., 1995; Yoshimori et al., 1990; Hotchkiss et al., 1998). En este trabajo reportamos, por primera vez, que PDI se localiza en la membrana citoplasmática de las células MA104 y Caco-2, permisivas a la infección por rotavirus, en una concentración muy inferior a la encontrada al interior de la célula (Fig 4C).

La presencia de PDI en estos sitios puede darse por un mecanismo aún no elucidado de exportación, existiendo rápidamente recambio de ésta; sin embargo, su función en membrana citoplasmática no está aún completamente determinada aunque sigue estando relacionada con las propiedades redox (Schwaller et al., 2003). La PDI asociada a la superficie celular está implicada en la reducción de los puentes disulfuro de la toxina de la difteria, que por esta vía adquiere la capacidad de entrar en la célula y desplegar su actividad citotóxica (Mandel et al., 1993). Está relacionada con cambios estructurales de las proteínas de diferentes virus, para un exitoso proceso infeccioso a las células; en el caso del virus HIV-1, los cambios conformacionales en la envoltura lipídica del HIV (Env), dependen de la acción coordinada de un sistema tripartita en el cual la PDI trabaja concertadamente con el receptor y correceptor, CD4 y CXCR4 respectivamente, al parecer inmersos en microdominios lipídicos "rafts" que sirven de plataforma y facilitan el proceso de entrada del virus (Markovic et al., 2003; Ou y Silver., 2006). Virus como el Sindbis, el baculovirus y vaccinia también dependen de la actividad disulfuro isomerasa para la entrada a la célula, aunque el mecanismo catalítico del intercambio tiol/disulfuro en éstos no ha sido definido (Abell BA, et al., 1993; Markovic et al., 1998; Locker et al., 1999).

En células MA104 y en las Caco-2, nosotros localizamos a PDI en los microdominios "rafts" de

la membrana celular, formando complejos proteicos con los receptores de rotavirus, las proteínas Hsc70 e integrina $\alpha\beta 3$. HSC70 ya ha sido reportada en los microdominios raft en células MA104 (López S 2006, Isa P. 2004), sin embargo la característica del complejo proteico PDI-Hsc70 y $\alpha\beta 3$ es la primera vez que se reporta.

El rotavirus en su proceso de ensamblaje hace uso de las "chaperonas" residentes en el retículo endoplasmático para plegar sus proteínas estructurales, la conformación de la proteína VP7 es altamente susceptible a la inactivación de la proteína disulfuro isomerasa, ya que este proceso inhibe la formación de los puentes disulfuro nativos de VP7 y por ende se inhibe el ensamblaje del virus, observándose este efecto como acumulación de DLPs en el lumen del retículo endoplasmático (Svensson et al., 1994; Mirazimi et al. 1998, Delmas, et al., 2004; Maruri-Avidal, et al., 2008). Dado que ese remodelaje de las proteínas estructurales a nivel de grupos tiolos es importante para el ensamblaje el virus, en este trabajo quisimos explorar si para la interacción con los receptores celulares, en el proceso de internalización, este proceso redox también está implicado.

Los resultados mostraron que la inhibición de la actividad disulfuro isomerasa de la superficie celular mediante DTNB y bacitracina disminuye la infección rotaviral en un modelo dosis dependiente y con un perfil saturable, sugiriendo que el rotavirus requiere de intercambios tiol-disulfuro en el transcurso de la infección celular. El diseño experimental realizado indicó que la interacción del rotavirus mediada por grupos tiolos transcurre en los eventos iniciales del proceso infeccioso en una etapa de pos-adherencia, ya que ni el DTNB ni la bacitracina impidieron la unión del virus a las células. Además, no hubo variación de los porcentajes de infección comparados con células infectadas sin tratamiento, cuando estos reactivos se adicionaron en la etapa de post-entrada.

Más aun, los inhibidores no afectan el estado redox de las TLPs de RRV ya que al adicionarse a éstas, el porcentaje de infección celular fue comparable al de las partículas sin tratar. Este resultado y el hecho que las TLPs de RRV no reaccionaran con el reactivo EZ-link Maleimide PEO2-Biotin indican la naturaleza oxidada de las proteínas virales. Cuando las células se incubaron con DTNB y luego éste fue removido por lavados antes del reto con el virus, se observó que la infección celular alcanzó porcentajes

La inhibición de la infección rotaviral, en células MA104, en presencia de anticuerpos anti-PDI fue dosis-dependiente y como en el caso del DTNB mostró un perfil saturable, con una inhibición del 90% a 10 µg/ml de anticuerpo anti-PDI. La inhibición por bloqueo de la PDI con anticuerpos, apoya los resultados obtenidos con los inhibidores químicos y sugieren que la PDI de la superficie celular interacciona con el rotavirus durante el proceso de entrada a la célula, en una etapa posterior a la unión del virus a la célula. La inhibición de la infección utilizando anticuerpos no descarta la actividad del tipo chaperona de la PDI sobre el rotavirus, porque al adicionar el anticuerpo anti-PDI se puede estar inactivando esta función; en cambio cuando se inhibe la infección con DTNB o la bacitracina se está alterando es la función de intercambio tiol-disulfuro de la PDI. Cuando se bloquea la PDI celular con anticuerpos la inhibición es hasta un 90%; mientras que bacitracina y DTNB inhiben la infección en un 70-75%. Esta diferencia en la inhibición se podría explicar por que el anticuerpo y los reactivos inhiben funciones diferentes de la PDI.

Este comportamiento es diferente al observado en el modelo de difteria y VIH, donde el 100% de inhibición de la infección se alcanzó con el aumento de la concentración de DTNB, mientras que con los anticuerpos anti-PDI la inhibición fue menor (Mandel et al., 1993; Ryser et al., 1991; 1994).

Una interacción directa entre las partículas rotavirales y PDI fue evidenciada en un sistema libre de células, utilizando PDI soluble, analizada mediante western blot y ELISA. Esa interacción también fue analizada en un sistema celular en el cual se marcó con biotina la PDI exterior y se bloquearon las cisteínas internas de la célula con NEM, luego de adherido el virus RRV a la célula; se logró detectar la presencia de PDI marcada con biotina y al menos VP4 en la fracción enriquecida en membranas, correspondiente a los microdominios lipídicos rafts, implicando la conformación de complejos proteicos en los que se incluye PDI-rotavirus en el proceso de entrada.

Para determinar que dominios de las proteínas viales interactúan con PDI, se seleccionaron secuencias peptídicas con cisteínas, que en el caso de VP7, éstas son totalmente conservadas en las diferentes cepas rotavirales consultadas que incluyeron cepas humanas, de porcino, de bovino y de simio. Los péptidos sintéticos de las regiones 200-219 de la proteína VP8, 189-210 y 243-264 de la proteína VP7

de la cepa RRV, están involucrados en el proceso de entrada del rotavirus a la célula ya que tanto los péptidos incubados con las células, como los anticuerpos dirigidos contra éstos inhiben la infección rotaviral. Al incubar las células con los péptidos modificados (Cys por Ser), se requiere mayor concentración de estos últimos para alcanzar el 50% de inhibición de la infección rotaviral, indicando una posible disminución en la afinidad, probablemente mediada por las proteínas de actividad disulfuro isomerasa de la superficie celular.

Los estudios publicados sobre la unión de PDI a péptidos indican interacciones tanto con el sitio catalítico redox como por su región "chaperona"; entre ellos, la interacción de PDI con la cadena polipeptídica de 28 residuos, aminoterminal de la nucleasa del staphylococcus, y también la somatostatina (Klappa, et al 1997; Quan et al., 1995; Xiaou R 2005). En estos casos, la afinidad de unión péptido-PDI aumenta cuando se incrementa la longitud del péptido, y para péptidos de igual longitud, aquellos que contienen cisteínas se unen 4 a 8 veces más fuertemente a PDI (Morjana y Gilbert, 1991).

Los resultados obtenidos con los péptidos sintéticos de las proteínas VP4 y VP7 son compatibles con lo reportado por Klappa et al, (1997 y Morjana y Gilbert (1991). En nuestro caso, explica la menor afinidad mostrada por el P9 sin cisteína, en el ensayo de inhibición de la infección rotaviral, en el cual para alcanzar el 50% de inhibición se necesitó hasta 0.90 mM de concentración del péptido. En cambio, esta misma inhibición se alcanzó con 0.34 mM de concentración del péptido original con cisteína, P8 de VP4 (Fig. 8B). Igual comportamiento fue encontrado con las secuencias peptídicas de VP7, en las que los péptidos originales con cisteínas presentaron afinidades mayores a las obtenidas con los péptidos modificados con serina. En este caso, para el péptido P2 la afinidad fue 4.5 veces mayor que para el péptido P3.

Según estos resultados de afinidad, relacionados con las concentraciones inhibitorias al 50%, sugieren que la secuencia de VP7 243-264 presenta una mayor afinidad a la célula con 0.18 mM, le sigue la secuencia de VP4 200-219 con 0.34 mM, y luego la secuencia de VP7 189-210 con 1.09 mM. Todos los péptidos modificados (cambio de Cys por Ser) presentaron mayor valor de concentración inhibitoria al 50% al compararlas con el péptido original. Se han descrito proteínas que no son miembros de la familia PDI que

muestran algún grado de actividad disulfuro isomerasa, algunas de ellas son las integrinas, la proteína espliceosomal humana y la fibronectina.

Las integrinas tienen 9 repeticiones CXXC en cada subunidad en los dominios ricos en cisteínas; la actividad tiol-disulfuro ha sido medida en experimentos libres de células, en procesos de renaturación de enzimas como la Ribonucleasa A; ensayos de inhibición de la actividad se han obtenido al incubar estas proteínas con bacitracina (O'Neill et al., 2000; Reuter, K. 1999; Langenbach et al., 1999; Weston et al., 2001).

En este trabajo no se puede descartar la probabilidad de que el dominio $\beta 3$, pueda también influir en este proceso redox en rotavirus ya que justamente, el péptido rotaviral CPN (161-169) de VP7 es el ligando de esta integrina en rotavirus. Sin embargo, el cambio de la Cys por Ser en este trabajo indicó que no afecta el porcentaje inhibitorio de la infección que ejerce el péptido CPN. Se ha reportado que la proteína transmembranal TM-SU del virus de la leucemia murina está implicada en la actividad de fusión membranar, para cual exhibe actividad de isomerasa que actúa sobre sus propios enlaces tiol-disulfuro por poseer es proteína viral en su secuencia el motivo catalítico CXXC (Wallin et al., 2004), motivo que está ausente en el caso de las proteínas rotavirales.

No se ha determinado si el rotavirus utiliza todas las moléculas candidatas a receptores, hasta ahora publicadas, o solo alguna de ellas, dependiendo de la línea celular y de la cepa de rotavirus. Probablemente algunos rotavirus inicialmente utilizan las

fracciones de ácido siálico y otros glicoconjugados, por el dominio galectina de la proteína VP8 (Dormitzer et al., 2002). Las interacciones secuenciales con las proteínas de la célula, probablemente dependen de qué receptores tiene la célula. Quizá diferentes cepas utilizan una o varias proteínas dependiendo de la disponibilidad en cada célula. Quizá también utilicen diferentes dominios de las proteínas virales, para producir los cambios conformacionales que el virus necesita, uniéndose en diferente momento con la misma proteína celular. Así, otras regiones expuestas por las que continuaría la interacción podría involucrar la parte carboxi Terminal de VP8 analizada en este trabajo, la región de 200 a 219, que podría ser de interacción con PDI.

Igualmente está las interacciones con diferentes integrinas, entre éstas, la integrina $\alpha 1\beta 2$ con el motivo DGE de VP5 y los diferentes dominios de VP7 con las integrinas $\alpha 1\beta 4$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y Hsc70 (Graham et al., 2003, 2005; Guerrero et al., 2000, 2002; Zárate et al., 2003, 2004; Coulson et al., 1997; López et al. 2006). Una de las interacciones de pos-adherencia es la región carboxi-terminal de VP5 con Hsc70 en un paso que es posterior a la temprana permeabilización de la membrana celular; además de la que involucra a VP6 con Hsc70 (Pérez-Vargas et al., 2006; Gualtero et al 2007). En todos estos pasos PDI podría estar involucrada, dado que el virus necesita la actividad tiol-redox para tener los cambios conformacionales indispensables para la unión sucesiva con las proteínas de la célula, durante su internalización celular.

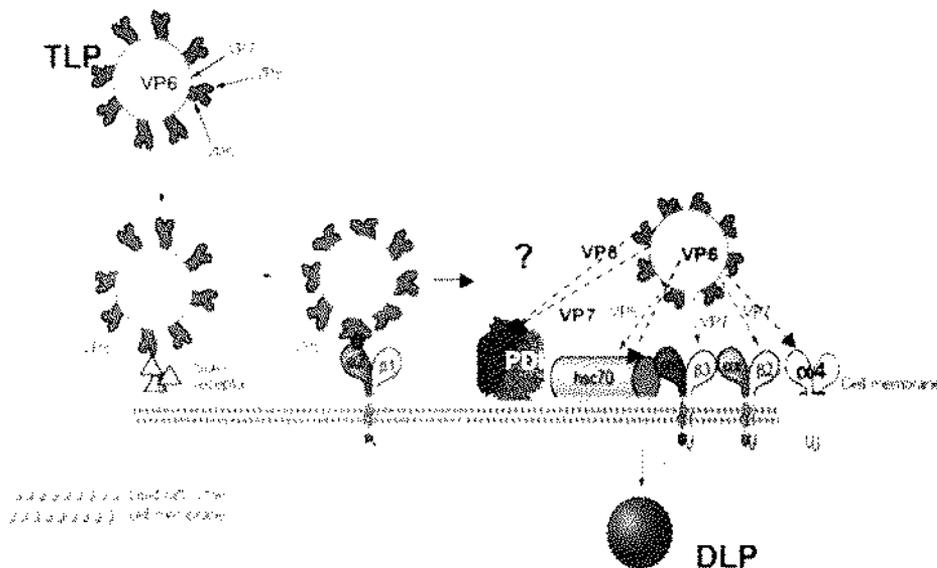


FIGURA 15. Mecanismo propuesto para la entrada de rotavirus, con adición de la participación de la PDI en un evento de post-unión pero antes de la internalización. Imagen modificada y adaptada de: López y Arias, 2004, y otras fuentes a saber: Graham et al., 2003, 2005; Superti et al., 1991; Isa, P et al., 1997; Rolsma, et al., 1998; Guo et al., 1999; Jolly et al 2000; Fiore et al 1991; Fuentes et al 1995; Dormitzer et al., 2002; Guerrero et al., 2000, 2002; Zárate et al., 2003, 2004; Coulson et al., 1997; Gualtero et al., 2007.

La incorporación de PDI al mecanismo propuesto de entrada del rotavirus se describe en la figura 15.

Lecturas Recomendadas

1. Abell BA, Brown DT. 1993. Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface. *J Virol* 67:5496-5501
2. Altenburg, B. C., D. Y. Graham, and M. K. Estes 1980. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol*. 46:75-85.
3. Angel, J., Franco, M.A. and Greenberg, H.B. 2007. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY*. 5: 529-39
4. Arias, C.F, Guerrero, CA, Méndez, E, Zárate, S, Isa, P, Espinosa, R, Romero, P, López, S. 2000. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). In *Gastroenteritis Viruses*. MK Estes and U Desselberger ed. John Wiley and Sons Ltd. New York.
5. Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol*. 70:5832-5839.
6. Bass, D. M., M. R. Baylor, C. Chen, E. M. Mackow, M. Bremond, and H. B.
7. Ciarlet, M. 2002b. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J. Virol*. 76, 1109-1123
8. Ciarlet, M. 2002a Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J. Virol*. 76, 4087-4095
9. Conner, M., S., Blatt. 2007 Rotavirus: to the gut and beyond! *Gastrointestinal infections Current Opinion in Gastroenterology*. 23(1):39-43
10. Coulson, B. S., S. H. Londrigan, D. J. Lee 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:5389-5394.
11. Cuadras M., Méndez E., Arias CF., López S. 1998. A new cysteine in rotavirus VP4 participates in the formation of an alternate disulfide bond. *Journal of General Virology*. 79, 2673-2677.
12. Delorme C, Brüssow H, Sidoti J, Roche N, Karlsson KA, Neeser JR, Teneberg S. 2001. Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J Virol*. 75:2276-2287.
13. Dennehy P.H. 2007. Rotavirus vaccines—An update *Vaccine* 25 (3137-3141) 3141.
14. Dormitzer, P.R. et al. 2002 Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J. Virol*. 76, 10512-10517.
15. Essex, D, Chan K, Swiatkowska M. 1995. Localization of PDI to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*, 86(6):2168-2173.
16. Estes M. K., Graham, D.Y. y Manso, B.B. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.*, 39, 879-888.
17. Estes, M. K. (1996). Rotaviruses and their replication. In "Virology" (N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), 3rd ed., pp. 1625-1655. Raven Press, New York.
18. Fiore, L. 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181: 553-563.
19. Freedman, R.B., P. Klappa. 1999. In Bukau, B. (Ed). *Protein Disulfide Isomerase: A catalyst of thiol:disulfide Interchange and Associated Protein Folding*. Harwood Academic Press. London, UK, pp. 437-459.
20. Graham, D. Y. and M. K. Estes. 1988. Viral infections of the intestine, p.566-578. In G. Gitnick (ed.), *Gastroenterology*. Medical Examination Publishing Company, New Hyde Park, N.Y.
21. Graham, K.L. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2-beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J. Virol*. 77, 9969-9978
22. Gajardo, R., P. Vende, D. Poncet, and J. Cohen 1997. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J. Virol*. 71:2211-2216.
23. Greenberg 1992. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J Clin Invest*. 90:2313-20.
24. Guerrero, C. A., E. Méndez, S. Zárate, P. Isa, S. López, and C. F. Arias. 2000. Integrin alpha(v)beta3 mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14644-14649.
25. Guerrero, C.A. 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol*. 74, 9362-9371
26. Guerrero, C. A. 2000. Identificación y caracterización del receptor de Rotavirus independiente de ácidos siálicos. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Autónoma de México
27. Guerrero, C. A., D. Bouyssouade, S. Zarate, R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, S. López, and C. F. Arias. 2002. The heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry *J Virol*. 76:4096-4102.
28. Hewish, M. J., Y. Takada, B. S. Coulson 2000. Integrins alphaXbeta2 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol*. 74:228-236.
29. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. 101(1): 67-81.
30. Jiang, X. M., Fitzgerald, M., Grant, C. M., and Hogg, P. J. (1999) *J. Biol. Chem*. 274, 2416-2423.
31. Jimena Pérez-Vargas, Pedro Romero, Susana López, and Carlos F. Arias*2006 The Peptide-Binding and ATPase Domains of Recombinant Hsc70 Are Required To Interact with Rotavirus and Reduce Its Infectivity. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Apr., p. 3322-3331 Vol. 80, No. 7.
32. Jolly, C.L. et al. (2000) Rotavirus infection of MA104 cells is inhibited by Ricinus lectin and separately expressed single binding domains. *Virology* 275, 89-97
33. Kapikian, A. Z., R. M. Chanock. 2000. Rotaviruses. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2 Raven Press, New York, p. 1787-1833
34. Kluwer Academic Publishers. Yoshimori, T., Semba, T., Takemoto, H., Akagi, S., Yamamoto, A., and Tashiro, Y. (1990) *J. Biol. Chem* 265, 15984-15990.
35. Langenbach KJ, Sottilie J 1999 Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin. *J Biol Chem* 274:7032-7038.

36. Locker JK, Griffiths G. 1999. An unconventional role for cytoplasmic disulfide bonds in vaccinia virus proteins. *J Cell Biol*.144:267-279
37. López, S., C. F. Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *TRENDS in Microbiology* 12: 271-278
38. López, S., Espinosa, R., Isa, P., Zárata, S., Méndez, E., Arias, C.F. 2000. Characterization of a Monoclonal Antibody Directed to the Surface of MA104 Cells that Blocks the Infectivity of Rotaviruses. *Virology* 273:160-168
39. López, T., López S., Arias CF. 2006. Heat shock enhances the susceptibility of BHK cells to rotavirus infection through the facilitation of entry and post-entry virus replication steps. *Virus Research*. 121 (1):74-83
40. López, S., Arias, C. F., Bell, J. R., Strauss, J. H., and Espejo, R. T. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144, 11-19.
41. Macer DR, Koch GL. 1988. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 91:61-70.
42. Mahmoud S, Shah Rabadi, Lorne A, Babiuk, Patrick W, K. Lee. 1987. Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology*, Volume 158, Issue 1, May, Pages 103-111
43. Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D. 1993. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4112-4116
44. Markovic I, Pulyaeva H, Sokoloff A, Chernomordik LV. 1998. Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *J Cell Biol*;143:1155-1166
45. Markovic, I., T. S. Stantchev, K. H. Fields, L. J. Tiffany, M. Tomi, C. D. Weiss, C.C. Broder, K. Strebel, K. A. Clouse. 2003. Thiol/disulfide exchange is a pre-requisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood*. First Edition Paper (05):1390
46. Mathieu, M., I. Petitpas, J. Navaza, J. Lepault, E. Kohli, P. Pothier, B. V. Prasad, J. Cohen, and F. A. Rey 2001, Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus. implications for the architecture of the virion. *Embo J*. 20:1485-1497.
47. Matthijnsens, J. et al. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol*. 80. 3801-3810 (2006).
48. Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 65:55-63
49. Mossel, E.C. and R.F. Ramig. 2003. A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol*. 77, 12352-12356
50. Méndez, E., López, S., Cuadras M, A., Romero, P., and Arias, C. F. 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* 263: 450-459.
51. M. Fenaux, M A Cuadras N Feng M James, and H B. Greenberg* Extraintestinal Spread and Replication of a Homologous EC Rotavirus Strain and a Heterologous Rhesus Rotavirus in BALB/c Mice. *J Virol*. 2006. Vol. 80, No. 11, p. 5219-5232
52. O'Neill S, Robinson A, Deering A, Ryan M, Fitzgerald DJ, Moran N. 2000. The platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem* 275 36984-36990
53. Ou W, Silver J. 2006. Role of protein disulfide isomerase and other thiol-reactive proteins in HIV-1 envelope protein-mediated fusion. *Virology* 350: 406-417
54. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12(2):304-6.
55. Patton, J. T., J. Hua, and E. A. Mansell 1993. Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J Virol*. 67:4848-4855.
56. Pavel I, Realpe M., Romero P, López S., Arias CF. 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, 322, (2): 370-38.
57. Pesavento, J.B., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2003. Structural organization of the genome in rotavirus. In: Desselberger, U., Gray, J. (Eds.), *Viral Gastroenteritis*, first ed., vol. 9. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 115-128
58. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol*. 199:269-275
59. Ramig RF. 2004 Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 78(19):10213-20.
60. Reuter K, Nottrott S, Fabrizio P, Luhmann R, Ficner R. 1999. Identification, characterization, and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kDa protein. *J Mol Biol* 294:515-525.
61. Ryser, H. J. P., Mandel, R., Gallina, A., and Rivera, A. (1997) in Propyl 4-Hydroxylase, Protein Disulfide Isomerase and Other Structurally Related pProteins (Guzman, N. A., ed) pp. 425-446, Marcel Dekker, Inc., New York
62. Ryser, H. J. P., Mandel, R., and Rivera, A. (1999) in Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease (Asard, H., Berczi, A., and Caubergs, R. J., eds) pp. 229-307.
63. Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:4559-4563
64. Schwaller M, Wilkinson B, Gilbert HF. 2003. Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem*. 278(9):7154-9.
65. Superti F, G. Donelli 1991. Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J Gen Virol*. Oct;72 (Pt 10):2467-74
66. Svensson, L., P. R. Dormitzer, B. C. von, L. Maunula, and H. B. Greenberg 1994. Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J. Virol*. 68:5204-5215.
67. Täger M, Kroning H, Thiel U, Ansoerge S. 1997. Membrane-bound protein-disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp Hematol* 25:601-607.
68. Trask SD, Dormitzer PR. 2006 Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol* 80: 11293-11304
69. Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H. O., Stockert, R. J., and Schilsky, M. L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270. 20410-20416.
70. Turano, C., S. Coppari, F. Altieri, A. Ferraro. 2002. Proteins of the PDI Family: Unpredicted Non-ER Locations and Functions. *J. Cell. Phys.* 193:154-163

71. Wallin M., Ekström M., Garoff H. 2004. Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *The EMBO Journal* 23, 54-65
72. Weston, B.S., Wahab, N., Roberts, T., Mason, R. 2001. Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose. *Kidney International*, Vol. 60: 1756-1764
73. Yaeger, M., M. Anderson. 2003. Rotavirus Still Impact Bottom Line. *TGE, National Hog Farmer* p. 3-5
74. Zai, A., Rudd, M. A., Scribner, A. W., and Loscalzo, J. (1999) *J. Clin. Invest.* 103, 393-399.
75. Zárate, S., M. A. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. O. Juárez, M. Camacho-Nuez, C. F. Arias, S. López. 2003. Interaction of Rotaviruses with Hsc70 during Cell Entry Is Mediated by VP5. *J Virol.* p. Vol. 77(13): 7254-7260
76. Zárate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Méndez, C. F. Arias, S. López 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol.* 74:593-599
77. Zárate, S., R. Espinosa, P. Romero, C. A. Guerrero, C. F. Arias, S. López. 2000. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology.* Vol 278 p 50 - 54
78. Zárate S, Cuadras MA, Espinosa P, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, Lopez S. 2003. Interaction of rotaviruses with HSC70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* 77: 7254-7260
79. Zárate S, Romero P, Espinosa R, Arias CF, Lopez S. 2004. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin $\alpha v \beta 3$ through a novel integrin-binding site. *J Virol* 78: 10839-10847