



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DEL COMPLEJO COPI/ARF1 EN LA MORFOGÉNESIS DE
ROTAVIRUS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ GUEVARA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. CARLOS F. ARIAS ORTIZ
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. GLORIA SAAB RINCÓN
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Carlos F. Arias Ortiz, en el laboratorio de los Dres. Carlos F. Arias y Susana López (Laboratorio 5, edificio “Sur”).

Asimismo, se contó con la colaboración del Dr. Oscar Burrone y la Dra. Francesca Arnoldi del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (“ICGEB” por sus siglas en inglés) (Trieste, Italia), la Dra. Catherine Eichwald del Instituto de Virología de la Universidad de Zúrich (Zúrich, Suiza), la Dra. Elizabeth Sztul del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Alabama en Birmingham (Birmingham, Alabama, USA) y el Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) de la UNAM.

Este proyecto fue desarrollado parcialmente con el apoyo económico del donativo IG200317 de la DGAPA/UNAM y el donativo A1-5-15356 del CONACyT. Durante la realización de este trabajo el autor contó con una beca otorgada por el CONACyT para sus estudios de doctorado (No. de beca 288777), así como con el apoyo del PAEP para asistir al X Congreso Nacional de Virología.

Comité tutorial:

Dra. Gloria Saab Rincón
Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres
Dr. Carlos F. Arias Ortiz

Jurado de examen de grado:

Presidente	Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Secretario	Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy
Vocal	Dr. Ramón Antonio González García-Conde
Vocal	Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
Vocal	Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Agradecimiento Técnico

El autor de esta tesis agradece la asesoría y el excelente apoyo técnico proporcionados por el M. en C. Marco Antonio Espinoza durante el desarrollo del presente trabajo.

A la pequeña Mia.

Siempre estarás en nuestros corazones y pensamientos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le doy las gracias a mis padres José Luis y María Guadalupe, ya que su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, es lo que me ha permitido llegar hasta aquí. Su confianza y fe en mí han sido los principales promotores de este sueño.

Asimismo, quiero agradecer a mis hermanas, Marcela y Carolina, por estar siempre presentes brindándome su apoyo. Su dedicación y resiliencia para superar los retos diarios han sido un ejemplo para nunca darme por vencido.

De forma especial también le agradezco a mi esposa María del Carmen por estar conmigo durante este tiempo, ya que a través de sus consejos, amor y paciencia he podido concluir esta meta.

Por otro lado, me gustaría que estas líneas también sirvieran para expresar mi agradecimiento al Dr. Carlos F. Arias por haberme guiado durante el desarrollo de mi doctorado. Su apoyo y confianza en mi trabajo, así como su disponibilidad y paciencia para analizar conmigo los problemas e ideas que surgieron día a día, fueron un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

De igual manera, quisiera agradecer a las Dras. Gloria Saab Rincón y Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres que formaron parte de mi comité tutorial, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron grandemente mi trabajo.

También quisiera agradecer a los Dres. Susana López, Tomas López, Carlos Sandoval y Pavel Isa, quienes de forma amable y generosa siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos y experiencias de manera desinteresada.

Agradezco también a mis amigos Marco, Joaquín y Carlos S. por los buenos momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio, así como por su ayuda para culminar con éxito la meta propuesta.

Finalmente, le doy gracias a todos miembros del grupo Arias/López, por su convivencia y los conocimientos compartidos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Rotavirus	3
1.2. Clasificación de rotavirus	4
1.3. Ciclo de replicación	4
1.4. Glicoproteínas de rotavirus	7
1.5. Viroplasmatas	10
1.6. Complejo COPI/Arf1	10
1.7. Factor de intercambio de Guanina GBF1	13
1.8. Gotas Lipídicas o LDs (del inglés “Lipid droplets”)	17
2. ANTECEDENTES	19
3. HIPOTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo General	22
4.2. Objetivos Específicos	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1. Líneas celulares y cepas de virus	23
5.2. Anticuerpos y reactivos	23
5.3. siRNAs y plásmidos	25
5.4. Análisis de células infectadas por microscopía electrónica de transmisión	25
5.5. Transfección de siRNAs y plásmidos	26
5.6. Tratamientos con endoglicosidasas y fosfatasa	26

5.7.	Análisis de espectrometría de masas (EM)	26
5.8.	Ensayos de infectividad de rotavirus	27
5.9.	Cuantificación viral por ensayo de inmunoperoxidasa	27
5.10.	Determinación de progenie viral infecciosa de rotavirus	28
5.11.	Viabilidad celular	28
5.12.	Análisis de proteínas por Western blot	29
5.13.	Ensayos de pulso y caza	29
5.14.	Ensayo de inmunofluorescencia	30
5.15.	Ensayo de microscopía de súper-resolución (MSR)	31
6.	RESULTADOS	32
6.1.	BFA y GCA no bloquean la gemación del DLPs hacia el interior del RE	32
6.2.	La modificación de VP7 inducida por BFA y GCA no está relacionada con una N- u O-glicosilación ni con una fosforilación	34
6.3.	Los tratamientos con BFA y GCA inhiben la trimerización de VP7	39
6.4.	La presencia de NSP4 facilita (directa o indirectamente) la trimerización de VP7	41
6.5.	El intercambiador de nucleótidos de guanina GBF1 es esencial para la morfogénesis de rotavirus	46
6.6.	La inhibición del metabolismo de lípidos reduce la replicación de rotavirus	56
6.7.	Los viroplasmata de rotavirus son estructuras altamente organizadas	64
7.	DISCUSIÓN	72
8.	CONCLUSIONES	79
9.	PERSPECTIVAS	80
10.	REFERENCIAS	81
	ANEXO I	96
	ANEXO II	117
	ANEXO III	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura de rotavirus _____	3
Figura 2.- Ciclo de replicación de rotavirus _____	6
Figura 3.- Estructura de VP7 _____	8
Figura 4.- Estructura de NSP4 _____	9
Figura 5.- Formación de vesículas recubiertas de COPI _____	12
Figura 6.- Organización de la estructura de GBF1 _____	14
Figura 7.- Estructura de las gotas lipídicas o LDs _____	17
Figura 8.- BFA y GCA no bloquean la gemación de partículas virales hacia el RE _____	33
Figura 9.- El cambio en la movilidad electroforética de VP7 inducida por BFA y GCA no está relacionada con una N- u O-glicosilación _____	35
Figura 10.- La movilidad electroforética de VP7 inducida por BFA y GCA no está relacionada con una fosforilación _____	36
Figura 11.- Cobertura de la secuencia de VP7 obtenida por EM _____	37
Figura 12.- BFA altera la movilidad de VP7 y NSP4 e induce una reducción en la replicación viral independientemente de la cepa de rotavirus evaluada _____	38
Figura 13.- BFA y GCA inhiben la trimerización de VP7 _____	40
Figura 14.- VP7 se localiza en el RE en presencia de BFA _____	41
Figura 15.-El silenciamiento de NSP4 inhibe la trimerización de VP7 _____	43
Figura 16.- La presencia de NSP4 facilita la trimerización de VP7 _____	44
Figura 17.- NSP4 se localiza en el RE en ausencia y presencia de BFA _____	46
Figura 18.-El silenciamiento de GBF1 inhibe la progenie viral de rotavirus _____	48
Figura 19.- La inhibición de GBF1 altera la movilidad electroforética de VP7 y NSP4 _____	49
Figura 20.- El silenciamiento de GBF1 inhibe la trimerización de VP7 _____	50
Figura 21.- Diagrama de la estructura primaria de la proteína mutante mVenus-GBF1/795 y de las diferentes variantes de esta proteína utilizadas en este estudio. _____	52
Figura 22.- La sobre-expresión de la proteína GBF1 revierte los efectos de BFA sobre la producción de virus infeccioso _____	53
Figura 23.- GBF1 no colocaliza con los viroplasmos de rotavirus _____	55
Figura 24.- El tratamiento con BFA no afecta la colocalización de los viroplasmos con las LDs _____	56
Figura 25.- El silenciamiento de metabolismo de lípidos inhibe la replicación viral de rotavirus _____	58
Figura 26.- Los tratamientos con C75, TOFA y DEUP reducen la producción de progenie viral de rotavirus _____	60
Figura 27.- Los tratamientos con C75, TOFA y DEUP no afectan la viabilidad de las células _____	61
Figura 28.-El tratamiento con C75, pero no con TOFA o DEUP, inhibe la infectividad de rotavirus _____	62
Figura 29.- Los tratamientos con C75, TOFA y DEUP no alteran la movilidad electroforética de las proteínas virales _____	63
Figura 30.- Los viroplasmos de rotavirus poseen una estructura de anillos concéntricos _____	65
Figura 31.- Análisis cuantitativo de la distribución espacial de las proteínas virales asociadas a los viroplasmos _____	67
Figura 32.- Los viroplasmos de rotavirus están organizados en 5 capas concéntricas _____	68
Figura 33.- La organización de los viroplasmos de rotavirus es independiente de su tamaño _____	69
Figura 34.- La organización los viroplasmos es independiente de la proteína de referencia elegida _____	71
Figura 35.- Modelo de incorporación de NSP4 en el interior de los viroplasmos _____	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Papel de GBF1 en la replicación de virus de RNA _____	15
Tabla 2 Anticuerpos primarios _____	24

ABREVIATURAS

69M	Rotavirus humano, cepa "69M"
Aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ACC1	Acetil-CoA carboxilasa 1
AiV	Virus de Aichi (siglas de "Aichivirus")
AP-1	Proteína adaptadora 1 (siglas de "Adaptor protein 1")
Arf	Factor de ribosilación de ADP (siglas de "ADP ribosilation factor")
ArfGAP1	Proteína activadora 1 de la GTPasa Arf (siglas de "Arf GTPasa activation Protein 1")
ATGL	Adipocito Triglicérido Lipasa
BFA	Brefeldina A
BIG	GEF inhibido por Brefeldina A (siglas de "Brefeldin A-inhibited GEF")
BSA	Albúmina sérica bovina (siglas de "Bovine seric albumine")
CVA21	Coxsackievirus A21
CVB3	Coxsackievirus B3
CVB4	Coxsackievirus B4
CHIKV	Virus chikungunya (siglas de "chikungunya virus")
COPI	Complejo proteico de cubierta I (siglas de "Coatomer Protein I")
COPII	Complejo proteico de cubierta II (siglas de "Coatomer Protein II")
CPT-I	Carnitina palmitoiltransferasa I
CSFV	Virus de la fiebre porcina clásica (siglas de "classical swine fever virus")
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DENV	Virus del dengue (siglas de "dengue virus")
DGAT1	Diacilglicerol O-aciltransferasa 1
DLPs	Partículas de doble capa (siglas de "Double-Layered particles")
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (siglas de "Enhanced Green Fluorescent Protein")
EM	Espectrometría de masas
Endo H	Endo-b-N-acetilglucosaminidasa H
ERGIC	Compartimiento intermedio entre el RE y el Golgi (siglas de "ER-Golgi intermediate compartment")

EV71	Enterovirus 71
FAS	Ácido graso sintasa (siglas de "Fatty acid synthase")
GBF1	Factor de resistencia a Brefeldina A específico del Golgi 1 (siglas de "Golgi-specific Brefeldin A-resistance factor 1")
GCA	Golgicida A
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor de intercambio de guanina (siglas de "Guanine exchange factor")
Glc	Glucosa
GTP	Guanosín trifosfato
HCV	Virus de la hepatitis C (siglas de "Hepatitis C virus")
HCoV-229E	Coronavirus humano 229E (siglas de "human coronavirus 229E")
HEV	Virus de la hepatitis E (siglas de "Hepatitis E virus")
Hpi	Horas post-infección
HPIV3	Virus de parainfluenza tipo 3 (siglas de "human parainfluenza virus 3")
Hpt	Horas post-transfección
HRV2	Rinovirus humano 2 (siglas de "human rhinovirus 2")
HRV14	Rinovirus humano 14 (siglas de "human rhinovirus 14")
Hsc	Proteína de choque térmico (siglas de "Heat shock cognate protein")
IAV	Virus de influenza (siglas de "influenza virus")
ISR	Imágenes de súper-resolución
KUN	Virus de Kunjin (siglas de "Kunjin virus")
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica (siglas de "Lymphocytic choriomeningitis virus")
LDs	Gotas Lipídicas (siglas de "Lipid Droplets")
LDH	Lactato deshidrogenasa
Man	Manosa
MHV	Virus de hepatitis de ratón (siglas de "Murine hepatitis C virus")
MOI	Multiplicidad de infección (siglas de "multiplicity of infection")
MSR	Microscopía de súper-resolución
NAc	N-acetilglucosamina
PAGE	Geles de poli(acrilamida) (siglas de "Polyacrilamide gels")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas de "Polymerase chain reaction")
PNGasa F	Péptido: N-glucosidasa F
Pol T7	RNA Polimerasa T7
RE	Retículo endoplásmico

RNA	Ácido ribonucleico (siglas de “Ribonucleic acid”)
RNAi	RNA de interferencia
Rpm	Revoluciones por minuto
RRV	Rotavirus de simio, cepa "Rhesus"
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR (siglas de “Reverse transcription-PCR”)
Sa11	Rotavirus de simio, cepa "Sa11"
Sa11CL28	Rotavirus de simio, "Sa11 clona 28"
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (siglas de “severe acute respiratory syndrome coronavirus”)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SINV	Virus Sindbis (siglas de “Sindbis virus”)
siRNA	ARN pequeño de interferencia (siglas de “small interfering RNA”)
ssRNA	RNA de cadena sencilla (siglas de “single-stranded RNA”)
SV40	Virus de simio 40 (siglas de “Simian virus 40”)
TBEV	Virus de encefalitis transmitida por garrapatas (siglas de “Thick-borne encephalitis virus”)
TLPs	Partículas de triple capa (siglas de “Triple-layered particles”)
TIRF	Fluorescencia de reflexión interna total (siglas de “Total internal reflection fluorescence”)
UFF	Unidades formadoras de focos
UK	Rotavirus bovino, cepa “UK”
VSV	Virus de la estomatitis vesicular (siglas de "Vesicular stomatitis virus")
YFV	Virus de la fiebre amarilla (siglas de “Yellow fever virus”)
YM	Rotavirus porcino, cepa “YM”
Ci	Curies

RESUMEN

Los rotavirus, miembros de la familia *Reoviridae*, son uno de los agentes etiológicos más importantes de gastroenteritis agudas en mamíferos durante sus primeros años de vida. En años recientes se ha avanzado en el conocimiento más preciso de los mecanismos moleculares empleados por estos virus para infectar exitosamente a la célula hospedera. Tal es el caso de la maquinaria de transporte COPI/Arf1, la cual ha demostrado ser esencial para el ensamblado de las partículas virales, ya que su inhibición mediante Brefeldina A (BFA) y Golgicida A (GCA) bloquea el ensamble de la capa externa del virus compuesta por las proteínas VP4 y VP7. Además de esto se ha encontrado que la maquinaria COPI/Arf1 también es importante para el procesamiento post-traducciona l de las glicoproteínas virales NSP4 y VP7.

En este trabajo encontramos que la inhibición del transporte COPI/Arf1 mediante BFA y GCA previene el ensamblado de la capa externa del virus al inducir un bloqueo en la trimerización de la proteína VP7, proceso que es esencial para que esta proteína se ensamble junto con VP4 en la partícula viral (Chen et al., 2009; López et al., 2005). Mediante ensayos de RNA de interferencia (RNAi) se descubrió que la acción de BFA y GCA sobre la morfogénesis de rotavirus es debido a la inhibición del intercambiador de nucleótidos GBF1, el cual activa a la GTPasa Arf1 para estimular el transporte mediado por COPI, ya que el silenciamiento de este factor demostró reducir significativamente la progenie viral al inhibir la trimerización de VP7. Además de esto, se observó que la ausencia de GBF1 afectó el procesamiento pos-traducciona l de NSP4 y VP7. Del mismo modo, se encontró que mientras la activación de Arf1 no es importante para rotavirus, la actividad catalítica de GBF1 es crítica para mantener la replicación viral.

Aunque la modificación post-traducciona l de VP7, que se demostró es diferente a su patrón de glicosilación, pudiera estar relacionada a su trimerización, en este trabajo se descubrió que la proteína NSP4 también podría estar involucrada en este proceso, dado que la inhibición de su expresión redujo la trimerización de VP7. En apoyo a esta propuesta, también se encontró que la proteína VP7 expresada de manera heteróloga se arregló en trímeros solamente cuando esta proteína fue co-expresada con NSP4.

Por otro lado, para tener un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la morfogénesis del virus, en este trabajo se analizó por medio de microscopía de súper-resolución la distribución espacial de diferentes proteínas virales asociadas a los viroplasmos de rotavirus a una escala nanométrica. De esta forma, se descubrió que los viroplasmos son organelos virales altamente organizados, en los cuales los componentes virales están ordenados en 5 capas concéntricas. NSP5 constituye el centro de estas estructuras, el cual está rodeado por una capa de las proteínas NSP2 y NSP4, seguida de una región ocupada por las proteínas VP1, VP2 y VP6. Finalmente, en la zona más externa se localizó una capa de VP4 seguida de un anillo formado por VP7.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Rotavirus

Las gastroenteritis infecciosas agudas son la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años en los países en desarrollo. Un número limitado de virus son los responsables de la mayor parte de los episodios diarreicos en niños pequeños, siendo los rotavirus uno de los agentes etiológicos más importantes de las hospitalizaciones y muertes por este padecimiento (Troeger et al., 2017). Los rotavirus, clasificados en la familia *Reoviridae*, son partículas icosaédricas que no están envueltas en una bicapa de lípidos. Están formados por tres capas de proteínas concéntricas que rodean al genoma viral constituido por once segmentos de RNA de doble cadena. La capa más interna está compuesta por la proteína VP2, que rodea a las proteínas VP1 (RNA polimerasa) y VP3 (guanililtransferasa), asociadas al genoma del virus. Estos elementos forman el núcleo viral de rotavirus sobre el cual se ensambla una capa intermedia formada por la proteína VP6, creando partículas de doble capa (“DLPs” por sus siglas en inglés). Finalmente, la capa más externa de proteínas se encuentra compuesta por la glicoproteína VP7, de la cual se proyectan espículas formadas por la proteína VP4, el ensamblado de estas dos proteínas permite la formación de la partículas infecciosas de tres capas (“TLPs” por sus siglas en inglés) (Estes y Greenberg, 2013; Glass, 2006) (Figura 1).

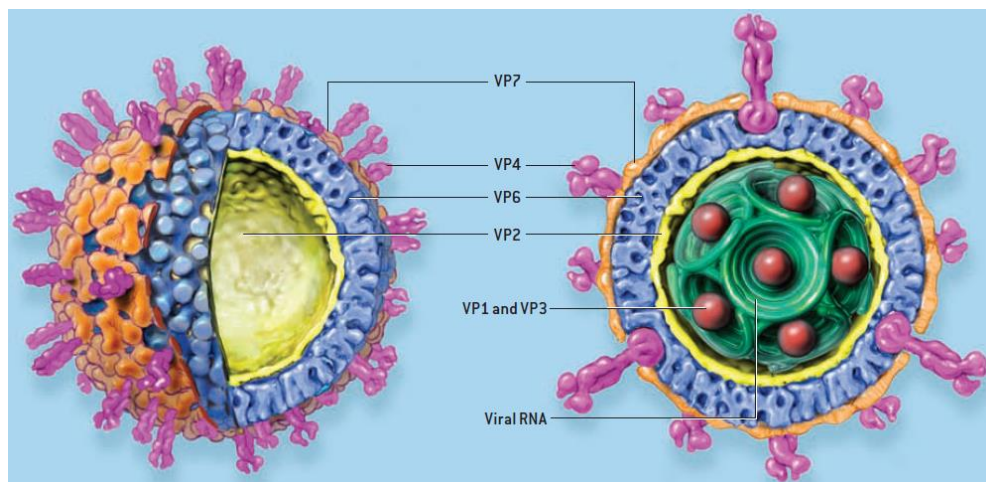


Figura 1.- Estructura de rotavirus. La partícula viral de rotavirus está constituida por tres capas concéntricas de proteínas que encierran al genoma viral compuesto de 11 segmentos de RNA de cadena doble. Las proteínas VP1 y VP3 unidas a los segmentos del genoma, junto con la proteína VP2 (amarillo) conforman el núcleo de la partícula. Sobre el núcleo viral se asienta una capa intermedia de la proteína VP6 (azul) para formar DLPs, sobre las cuales se acoplan las proteínas de capa externa VP7 (naranja) y VP4 (lila) para formar las partículas infecciosas de tres capas. (Tomado de Glass, 2006).

1.2. Clasificación de rotavirus

Las diferentes cepas de rotavirus se pueden clasificar serológicamente en múltiples grupos de acuerdo a la reactividad de diferentes anticuerpos hacia la proteína VP6. Con base en estos determinantes antigénicos, los rotavirus se han dividido en siete distintos serogrupos primarios (A-G), de los cuales, los serogrupos A, B y C incluyen virus que pueden infectar tanto a animales como humanos, mientras que los serogrupos D, E, F y G contienen virus que solo infectan animales. El grupo A de rotavirus es el más importante epidemiológicamente para los humanos (Estes y Greenberg, 2013). Dentro de este grupo, los rotavirus se han clasificado en diferentes serotipos y genotipos dependiendo de la secuencia de las proteínas VP4 y VP7 que forman la capa externa. Utilizando anticuerpos neutralizantes se han definido 27 serotipos **G** (Glicoproteína) de VP7 y 18 serotipos **P** (proteína sensible a Proteasa) de VP4. Asimismo, de acuerdo a la secuencia de VP4, los rotavirus además pueden dividirse en 35 genotipos P (Estes y Greenberg, 2013). Tomando en cuenta la clasificación basada en VP7 y VP4, la nomenclatura de las distintas cepas de rotavirus puede definirse como GxPy[z], donde la letra “x” establece el número de serotipo G, la letra “y” define el serotipo P y la letra “z” contenida en corchetes denota el genotipo P (Matthijssens et al., 2011).

1.3. Ciclo de replicación

Los rotavirus se replican exclusivamente en el citoplasma mediante un proceso altamente complejo que comienza con la unión del virus a la superficie de la célula hospedera mediante diferentes receptores celulares. Una vez unido a la superficie celular, este virus puede entrar a la célula a través de distintas vías endocíticas (Gutierrez et al., 2010) (Figura 2, paso 1). Después de su endocitosis los virus internalizados son liberados al citoplasma como DLPs para comenzar la transcripción de los mRNAs a partir de cada uno de los segmentos del genoma viral (Crawford et al., 2017) (Figura 2, pasos 2 y 3). Posteriormente, los mRNAs dirigen la síntesis de proteínas virales, algunas de las cuales son reclutadas a estructuras citoplasmáticas electro-densas denominadas viroplasmatas (Figura 2, paso 4). Además de las 6 proteínas estructurales descritas anteriormente (VP1-VP4, VP6 y VP7), en la célula infectada se sintetizan 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6), las cuales no se incorporan al virión, pero son importantes para la replicación del virus.

En los viroplasmos se localizan la mayoría de las proteínas estructurales del virus (VP1, VP2, VP3 y VP6), así como las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, que representan los componentes mayoritarios de estas estructuras (Estes y Greenberg, 2013). Los viroplasmos representan las fábricas en donde se lleva a cabo la replicación y el empaquetado del genoma durante el ensamblado de nuevas DLPs (Patton et al., 2006b) (Figura 2, paso 5 y 6). Posteriormente, las nuevas DLPs geman hacia el interior del retículo endoplásmico (RE), a través de sitios de la membrana modificados por la presencia de VP7 y por una segunda glicoproteína viral, llamada NSP4, a la cual además pueden asociarse las espículas de la proteína VP4 (Figura 2, paso 7) (Maass y Atkinson, 1990; Soler et al., 1982; Suzuki et al., 1993). Se ha descrito que la asociación de NSP4 con la proteína VP6 de las DLPs actúa como receptor para la inducción del proceso de gemación de estas partículas hacia el interior del RE, proceso durante el cual las partículas adquieren una membrana transitoria que contiene a las proteínas NSP4, VP7 y VP4 (Au et al., 1989; Chasey, 1977; Poruchynsky y Atkinson, 1991).

Posteriormente, conforme la partícula viral avanza hacia el interior del RE, la bicapa lipídica adquirida durante el proceso de gemación es removida junto con NSP4, permitiendo simultáneamente el ensamble de las proteínas VP7 y VP4, para producir así las partículas maduras finales de triple capa, que son infecciosas (Figura 4, paso 8) (Petrie et al., 1981; Suzuki et al., 1993). Aunque el mecanismo de remoción de la capa transitoria de lípidos no se conoce, se ha sugerido que la proteína VP7 puede ser importante para este proceso, ya que en condiciones en que se ha disminuido su síntesis por RNAi, o bien por un tratamiento prolongado de la célula con un agente reductor que impida la formación de puentes disulfuro y el plegamiento correcto de VP7, se previene la pérdida de lípidos de las partículas intermediarias, las cuales se acumulan en el lumen del RE (López et al., 2005; Svensson et al., 1994).

Asimismo, se ha encontrado que la maduración de las partículas de rotavirus es un proceso que depende de calcio, ya que tratamientos que disminuyen los niveles de calcio en el RE reducen la producción viral al bloquear la pérdida de la capa de lípidos de las partículas intermediarias (Poruchynsky y Atkinson, 1991; Shahrabadi et al., 1987; Shahrabadi y Lee, 1986).

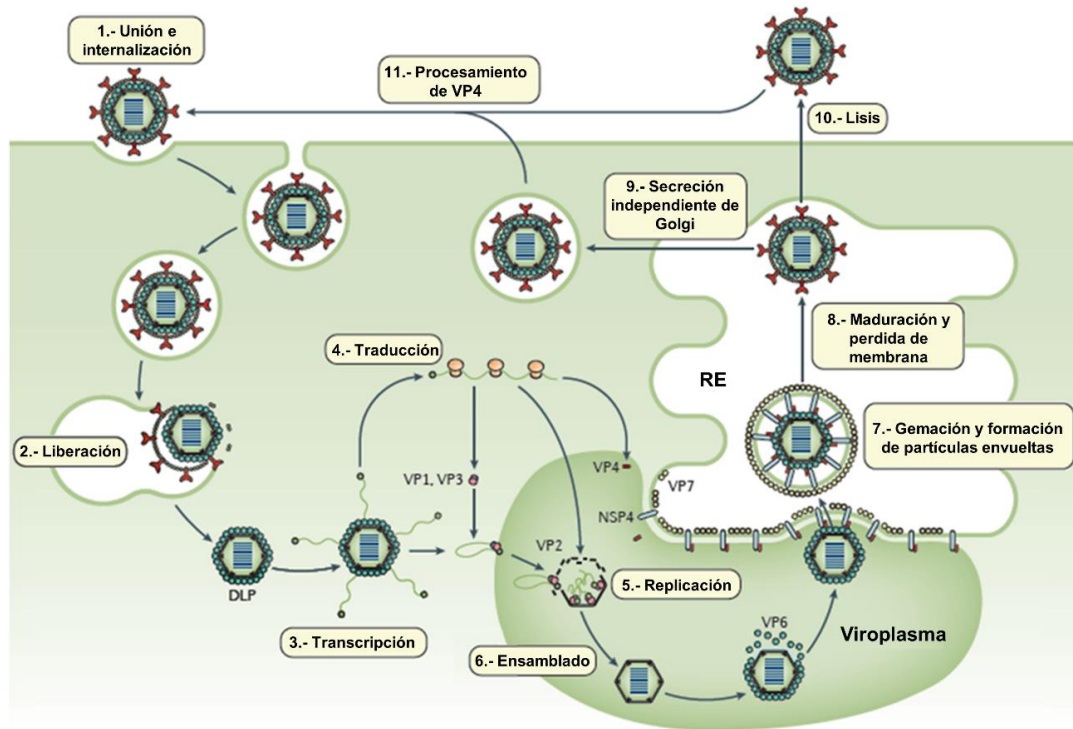


Figura 2.- Ciclo de replicación de rotavirus. El virión de rotavirus se une a la superficie celular a través de receptores celulares en la membrana (Paso 1) y es internalizado por medio de distintas vías endocíticas hacia los endosomas, a partir de los cuales es liberado en forma de DLP al citoplasma (Paso 2). Una vez en el citoplasma, las DLPs producen los mRNAs encargados de dirigir la síntesis de las proteínas virales (Paso 3 y 4). Posteriormente, algunas proteínas virales (VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2 y NSP5) son reclutadas en los viroplasmos donde se lleva a cabo la replicación del genoma y el ensamblado de nuevas DLPs (Paso 5 y 6). Las nuevas DLPs geman hacia el interior del RE (Paso 7), donde adquieren la capa externa de proteínas para convertirse en partículas de TLPs maduras (Paso 8), las cuales son liberadas al medio extracelular mediante exocitosis o lisis celular (Paso 9). Finalmente, la maduración proteolítica de VP4 en las TLPs activa a las partículas virales para que puedan iniciar un nuevo ciclo de replicación (Paso 10) (Tomado y modificado de Crawford et al. 2017).

El calcio se requiere durante la morfogénesis de rotavirus, ya que es necesario para la formación de los trímeros de VP7, los cuales son esenciales para el ensamblado de esta proteína sobre las DLPs. Se ha sugerido que la interacción entre trímeros de VP7 durante su ensamblado en la partícula excluye eventualmente la membrana de lípidos adquirida durante la gemación (Aoki et al., 2009; Estes y Greenberg, 2013).

Finalmente, las nuevas partículas de TLPs son liberadas al medio extracelular por medio de una ruta exocítica independiente del Golgi en células Caco-2 polarizadas o por lisis celular en células MA104 no polarizadas (Figura 4, paso 9 y 10), aunque también se reportó recientemente la salida del virus de estas últimas células por un mecanismo no lítico que depende de actina (Trejo-Cerro et al., 2018). Una vez liberadas las nuevas partículas, requieren del corte proteolítico de VP4, por tripsina, para producir los fragmentos de VP8 y VP5 presentes en las

partículas infecciosas finales y así comenzar un nuevo ciclo de replicación (Figura 4, paso 11) (Crawford et al., 2017; Estes y Greenberg, 2013).

1.4. Glicoproteínas de rotavirus

1.4.1. VP7

VP7 (38 kDa) es una glicoproteína de 326 aminoácidos (aa) codificada por el gen 9 de rotavirus (Estes y Greenberg, 2013). Su traducción inicia a partir de un codón de inicio con una secuencia consenso débil, no obstante, esta proteína también contiene un codón de inicio secundario con una secuencia consenso más fuerte, el cual está ubicado 30 codones río abajo. Cada uno de los codones de inicio precede a dos regiones hidrofóbicas denominadas H1 y H2, respectivamente (Figura 3a), que tienen el potencial de funcionar como péptido señal para dirigir esta proteína hacia la membrana del RE en donde es insertada y translocada de modo que VP7 quede orientada hacia el lado luminal de este organelo (Stirzaker et al., 1990, 1987). Durante su síntesis, de manera co-traduccional, el péptido señal (primeros 50 aa) es retirado mediante un corte proteolítico por la señalasa del RE (eukaryote signal peptidase) (Figura 3a). Si bien VP7 no posee una señal de retención en el RE, como la secuencia de Lisina-Aspartato-Glutamato-Leucina (KDEL) que posee la mayoría de las proteínas residentes del RE, sin embargo, se ha descrito que dos señales ubicadas en las regiones de aa 51-61 (QNYGINLPITG) y 62-111 (SMDTAYANSTQEETFLTSTLCLLYPTEAATEINDNSWKDTLSQLFLTKGW) son importantes para su ubicación en el RE; asimismo, los residuos ITG (isoleucina-treonina-glicina, aa 9-11) en el extremo N-terminal de la proteína también son críticos para su retención (Maass y Atkinson, 1994).

Por otro lado, durante su translocación a través de la membrana del RE, esta proteína es modificada mediante N-glicosilación en la asparagina (Asn) 69 con una cadena de carbohidratos constituida por 2 residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc), 9 residuos de manosa (Man) y 3 residuos de glucosa (Glc) (Glc₃Man₉GlcNAc₂). Esta cadena es posteriormente procesada por las enzimas Glucosidasa I y II, así como por la manosidasa del RE (enzimas residentes del RE), que remueven residuos de manosa y glucosa, generando dos perfiles de glicosilación (Man₅GlcNAc₂ o Man₆GlcNAc₂) que están asociados a la proteína VP7 madura presente en la partícula viral (Freeze, 1999; Maass y Atkinson, 1994; Stirzaker et al., 1990, 1987).

La estructura terciaria de VP7 contiene 4 puentes disulfuro, los cuales son importantes para su correcto plegamiento y su ensamblado en la capa externa (Figura 3a) (Chen et al., 2009; Mirazimi y Svensson, 2000). Para incorporarse al virión y formar la capa externa del virus la proteína VP7 requiere estar en forma trimérica, lo cual depende de la presencia de iones Ca^{2+} en la unión de los monómeros de VP7 (Figura 3b). La participación de iones Ca^{2+} libres para la formación de los trímeros de VP7 es de especial importancia para la estabilización de la capa externa de las partículas virales, ya que en concentraciones menores de 100nm de calcio la capa externa se desprende de las TLPs para generar las DLPs (Aoki et al., 2009; Estes y Greenberg, 2013; Ruiz et al., 1996).

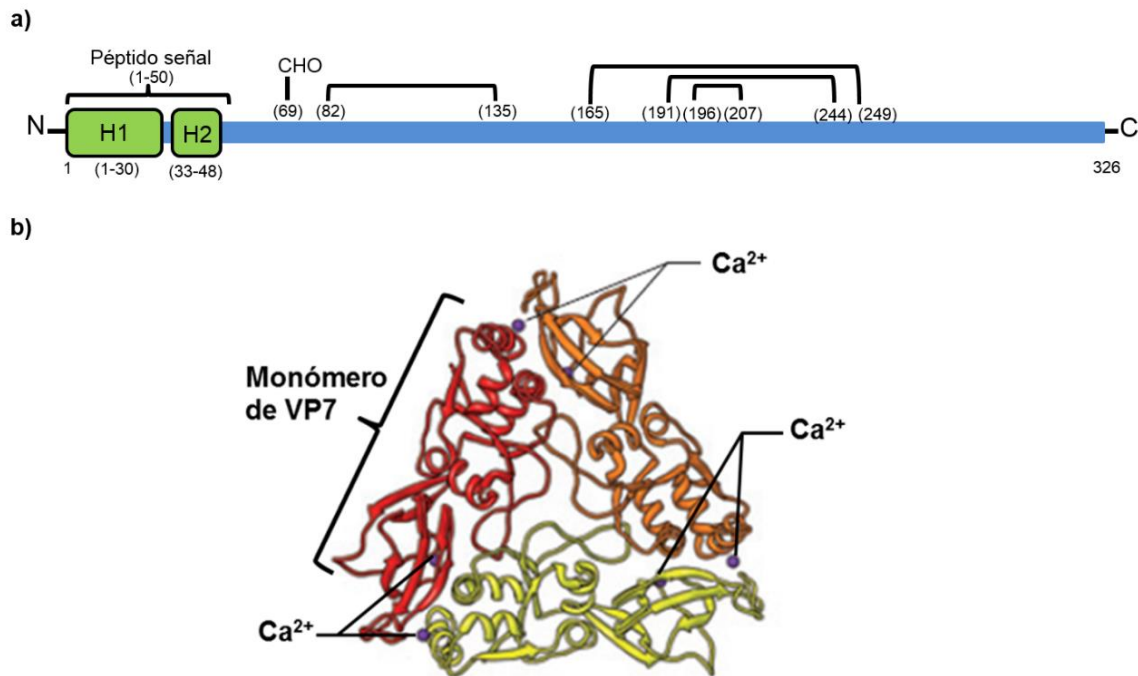


Figura 3.- Estructura de VP7. a) Diagrama de la estructura primaria de VP7, donde se puede observar el péptido señal que contiene las zonas hidrofóbicas H1 y H2. De igual forma se muestra la posición de la Asn 69 a la cual se une la cadena de carbohidratos rica en manosa, así como el patrón de los puentes disulfuro de esta proteína con los números correspondientes a la posición de los residuos de cisteína. Los números en paréntesis indican la posición de los aa (Tomada y modificada de (Chen et al., 2009)). b) Diagrama de un trímero de VP7, en el cual se puede observar la ubicación de los iones Ca^{2+} (morado) ubicados entre la unión de los monómeros de VP7 (Tomada y modificada de Aoki et al. 2009).

1.4.2. NSP4

NSP4 (20 kDa) es una glicoproteína no estructural codificada por el gen 10 de rotavirus que contiene tres codones de iniciación en fase. Su traducción comienza a partir del primer codón de inicio que posee la secuencia consenso más fuerte, dando como resultado una proteína

de 175 aa en el rotavirus Sa11, la cual contiene tres regiones hidrofóbicas (H1, H2 y H3) ubicadas hacia su extremo N-terminal (Baybutt y McCrae, 1984; Powell et al., 1988) (Figura 4). NSP4 es insertada en la membrana del RE mediante la región H2, quedando con una orientación citosólica (Bergmann et al., 1989; Estes y Greenberg, 2013). Asimismo, durante su traducción esta proteína es modificada mediante N-glicosilación en las Asn 8 y 18 de la región H1 con dos cadenas ricas en manosa ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), las cuales, a diferencia de VP7, se procesan hasta cadenas con 8 Man ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$). La posición de estas cadenas de carbohidratos ha llevado a suponer que NSP4 no está sujeta a algún corte proteolítico por la señalasa del RE como en el caso de VP7 (Kabcenell y Atkinson, 1985).

Para NSP4 se ha encontrado que la secuencia de retención en el RE se encuentra entre los aa 85-123 ubicados de su lado citoplasmático (Mirazimi y Svensson, 2000).

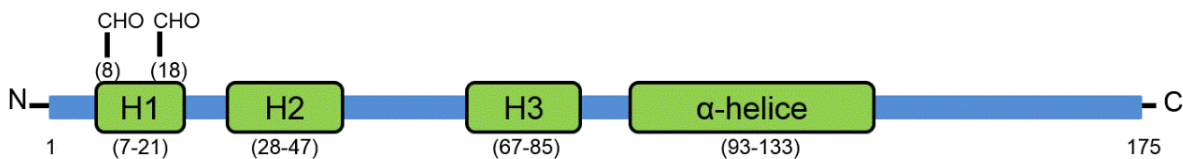


Figura 4.- Estructura de NSP4. Diagrama de la estructura primaria de NSP4 en donde se puede observar la posición de los tres dominios hidrofóbicos H1, H2 y H3 de la proteína, así como la posición de las Asn (8 y 18) modificadas con cadenas de carbohidratos ricos en manosa y la región de la estructura de α -hélice que es esencial para la oligomerización de esta proteína. Los números en paréntesis indican la posición de los aminoácidos para cada dominio.

Intracelularmente NSP4 puede encontrarse en forma de dímeros y tetrámeros (principalmente en la membrana) (Maass y Atkinson, 1994), los cuales se forman por la presencia de una estructura α -hélice ubicada hacia el extremo C-terminal de NSP4 (Figura 4) (Taylor et al., 1996). Por otro lado, a diferencia de VP7, NSP4 no contiene puentes disulfuro intramoleculares; no obstante, se ha propuesto que los únicos residuos de cisteínas presentes en NSP4 (aa 63 y 71) ubicados en la región citosólica H3 podrían contribuir en la oligomerización de esta proteína (Maass y Atkinson, 1990).

Como se mencionó anteriormente, NSP4 también interactúa con las proteínas VP7 y VP4 para formar un complejo hetero-oligomérico, el cual se forma por la asociación de VP7 y VP4 con el extremo N-terminal y C-terminal de NSP4, respectivamente. Asimismo, además de esta interacción, el extremo C-terminal de NSP4 también puede unirse a la proteína VP6 de las DLPs para permitir su gemación hacia el RE (Au et al., 1993; Maass y Atkinson, 1990).

1.5. Viroplasmias

Como se mencionó anteriormente, los viroplasmias representan las fábricas virales donde se realiza la replicación del genoma viral y el ensamblado de nuevas partículas de rotavirus. El ciclo de replicación de rotavirus en cultivos celulares es un proceso relativamente rápido, el cual alcanza un máximo en la producción viral después de 10 a 12 horas post-infección (hpi) (Estes y Greenberg, 2013). La formación de viroplasmias comienza entre las 2 y 4 hpi como pequeños puntos distribuidos en el citoplasma, los cuales crecen progresivamente conforme avanza la infección, llegando a alcanzar un tamaño de entre 10 y 20 μm (Carreño-Torres et al., 2010; Patton et al., 2006a).

Si bien se desconoce el mecanismo de biogénesis de los viroplasmias, en años recientes se ha encontrado que las gotas lipídicas (“LDs” por sus siglas en inglés) también juegan un papel esencial en este proceso. Dada su alta co-localización con las proteínas NSP2 y NSP5, se ha propuesto que las LDs sirven como andamios para el ensamblado de estas proteínas, las cuales posteriormente reclutan a las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6 para formar estructuras parecidas a viroplasmias. Finalmente, estas estructuras maduran mediante un proceso desconocido, el cual remueve los lípidos internos, para formar los viroplasmias maduros finales (Cheung et al., 2010).

Por otro lado, se ha observado que el mecanismo de crecimiento de los viroplasmias parece diferir dependiendo de la cepa de rotavirus, ya que mientras para las cepas OSU (porcina) y RRV (simio) se observa un incremento sostenido en el número y tamaño de los viroplasmias (Campagna et al., 2007; Carreño-Torres et al., 2010), para el rotavirus de simio Sa11 se ha encontrado que existe una disminución en el número de viroplasmias a expensas del incremento en su tamaño, indicando que el crecimiento de los viroplasmias de Sa11 pareciera estar relacionado a un proceso de fusión entre estos organelos (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006; Eichwald et al., 2004).

1.6. Complejo COPI/Arf1

El complejo COPI/Arf1 es el encargado de mediar el transporte retrógrado que ocurre del aparato de Golgi hacia el RE, así como el transporte entre las cisternas del aparato de Golgi (Beck et al., 2009), mediante vesículas recubiertas con el complejo de proteínas COPI, que son

capaces de capturar de forma eficiente proteínas de membrana. Las proteínas de membrana que se capturan poseen alguno de los motivos di-lisina KKxx o KxKxx (donde x es cualquier aa), así como proteínas luminales con la secuencia KDEL en su extremo C-terminal (Kirchhausen, 2000). Recientemente se ha descrito que estas vesículas además son importantes en el transporte de proteínas desde el RE hasta las LDs, lo que permite mantener la estabilidad y función de éstos (Beller et al., 2008; Ellong et al., 2011; Guo et al., 2008; Wilfling et al., 2014).

En el evento inicial del transporte mediado por vesículas recubiertas con COPI, la GTPasa Arf1 (del inglés, ADP ribosylation factor 1) unida a GDP (Arf1-GDP) se asocia con la proteína GBF1 (del inglés, Golgi-specific Brefeldin A-resistance factor 1) (Figura 5, paso 1), la cual es un factor de intercambio de guanina (“GEF” por sus siglas en inglés) que activa a la proteína Arf1-GDP al promover el intercambio del GDP unido a Arf1, por una molécula de GTP. Este intercambio induce un cambio conformacional en Arf1 que expone un ácido mirístico unido a esta proteína, el cual permite la asociación de Arf1-GTP a la membrana (Figura 5, paso 2) (Antonny et al., 1997). Posteriormente, la proteína Arf1-GTP promueve la unión de varios grupos del complejo COPI (constituido por 7 subunidades diferentes [α , β , β' , δ , ϵ , γ y ζ]) y el reclutamiento de la proteína ArfGAP1 (del inglés “Arf-GTPase-activating protein 1”) (Figura 5, paso 3). La unión y polimerización del complejo Arf1-GTP-COPI-ArfGAP1 origina la unión y concentración de las proteínas cargo a ser transportadas (Figura 5, paso 4), así como la deformación de la membrana que permite la creación de una vesícula recubierta de COPI (Figura 5, paso 5). Una vez completa la vesícula, ésta es escindida debido a la misma deformación creada en la membrana, dando lugar a una vesícula reabierta de COPI (Figura 5, pasos del 6). Finalmente, la proteína ArfGAP1 estimula la actividad GTPasa de Arf1 provocando la hidrólisis del GTP unido a esta proteína, lo cual induce la disociación de Arf1, ArfGAP1 y los complejos COPI de la vesícula para producir la vesícula final encargada del transporte (Figura 5, paso 7) (Popoff et al., 2011).

Dentro de este complejo proceso se ha propuesto que la activación de Arf1 es el paso crucial que regula la formación de vesículas de COPI. Arf1 pertenece una familia de proteínas de unión a guanina de bajo peso molecular que puede ser dividida en proteínas Arfs de Clase I (Arf1, Arf2 y Arf3), Clase II (Arf4 y Arf5) o Clase III (Arf6), de acuerdo a su secuencia. Las proteínas Arfs de Clase I se encuentran altamente conservadas en todos los organismos

eucariotas que se han analizado hasta la fecha, excepto por Arf2 que no está presente en mamíferos. Asimismo, se ha encontrado que estas proteínas pueden actuar en varios procesos regulatorios relacionados con el tráfico de membranas, metabolismo de lípidos, morfología de organelos y señalización (Chavrier y Ménétrey, 2010; Donaldson y Jackson, 2011; Kahn et al., 2006). Dado que Arf1 es el miembro más abundante de las proteínas Arfs, se ha supuesto de forma general que esta proteína es la responsable principal de la mayoría de los eventos de transporte vesicular. Sin embargo, en años recientes se ha encontrado que las diferentes proteínas Arfs pueden llegar a tener funciones únicas que controlan pasos específicos del transporte (Volpicelli-Daley et al., 2005).

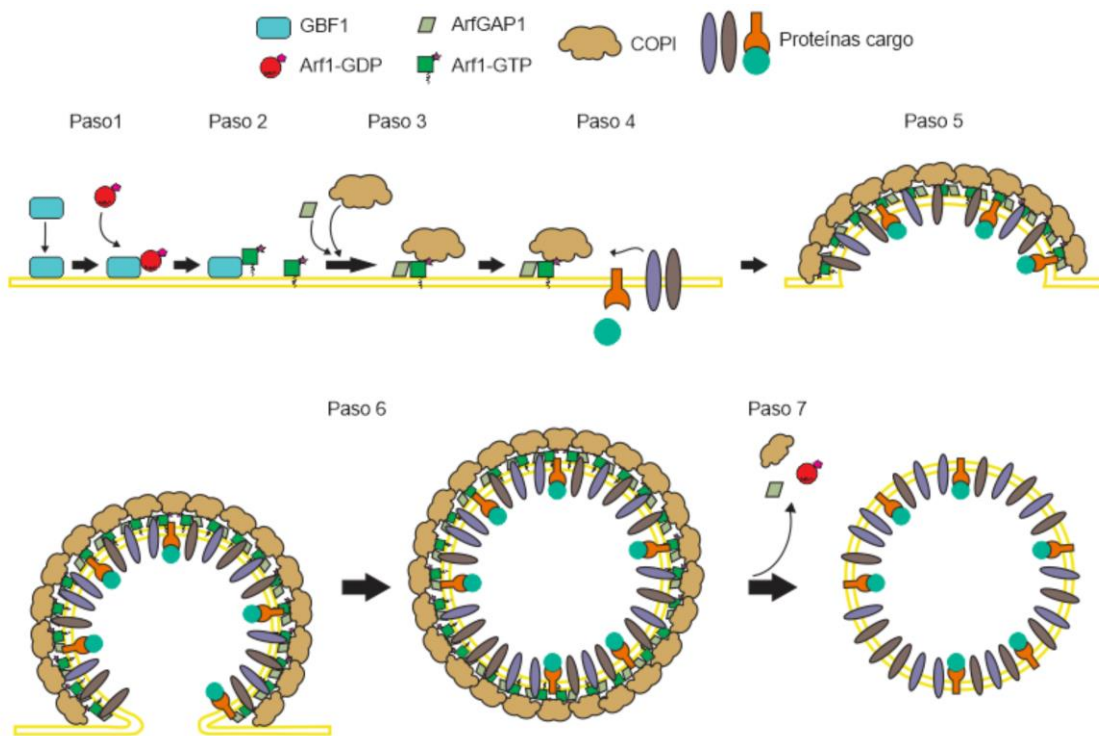


Figura 5.- Formación de vesículas recubiertas de COPI. La formación de las vesículas recubiertas por COPI inicia cuando la GTPasa Arf1 unida a GDP (Arf1-GDP) se asocia al factor GBF1 (Paso 1), el cual activa a Arf1 al intercambiar el GDP por una molécula de GTP (Paso 2). Una vez activada, Arf1-GTP se asocia a la membrana e induce el reclutamiento del complejo COPI junto con la proteína ArfGAP1 (Paso 3). La formación del complejo Arf1-GTP-COPI-ArfGAP1 induce la incorporación de las proteínas cargo (Paso 4) y la deformación de la membrana permitiendo la creación de la vesícula (Paso 5), cuando el recubrimiento de COPI se completa la vesícula formada se libera (Paso 6). La inactivación de Arf1 debido a la actividad de ArfGAP1 promueve el desacoplamiento de las proteínas de cubierta para producir la vesícula de transporte final (Paso 7). (Tomado de Martínez y Arias, 2020).

Además de las proteínas Arfs, la participación de GEFs específicos también ha demostrado ser crucial para la regulación del transporte vesicular. Por ejemplo, la activación de Arf1 puede realizarse por medio del intercambiador de nucleótidos GBF1 para promover el

transporte vesicular de COPI, o también por medio de los intercambiadores BIG1 o BIG2 (del inglés “Brefeldin A-inhibited GEFs”) para iniciar el transporte vesicular mediado por clatrina. Se ha propuesto que estas diferentes funciones de Arf1 en el transporte están determinadas por su unión con los respectivos GEFs, los cuales se encuentran restringidos a los sitios específicos de donde iniciará el proceso de transporte, comprometiendo a Arf1 a inducir la formación de una vesícula especial. De este modo, mientras GBF1 está ubicado en la cisterna del cis-Golgi, así como en el ERGIC y las LDs, donde funciona el complejo COPI, los intercambiadores BIG1 y BIG2 están localizados específicamente en la cara trans del Golgi, donde participan en el transporte mediado por clatrina. Con base en estas observaciones se ha propuesto que la regulación del transporte vesicular depende de la precisa interacción espacio-temporal de un GEF específico con las proteínas Arfs (Bouvet et al., 2013; Kaczmarek et al., 2017).

1.7. Factor de intercambio de Guanina GBF1

El factor GBF1 es una proteína de alto peso molecular (210 kDa), la cual al igual que los demás GEFs puede encontrarse como una proteína soluble o como una proteína unida a membrana (Niu et al., 2005). De acuerdo a su tamaño, GBF1 se agrupa junto con BIG1 y BIG2 en la familia de Ges de alto peso molecular, los cuales comparten un dominio catalítico denominado Sec7 (Figura 6) que facilita el intercambio del GDP unido a las proteínas Arfs por una molécula de GTP (García-Mata y Sztul, 2003; Meissner et al., 2016). Primero, las proteínas Arfs unidas a GDP se asocian al dominio Sec7, esta unión induce un cambio conformacional en las proteínas Arfs que acerca el GDP hacia un residuo de ácido glutámico (Glu) localizado en la posición 794 de GBF1. La proximidad entre las cargas negativas del Glu con las de los fosfatos del GDP estimula la expulsión del nucleótido. Finalmente, debido al exceso de GTP en comparación con el GDP, las proteínas Arfs se unen a una molécula de GTP libre, el cual induce la disociación del complejo GBF1-Arf-GTP (Goldberg, 1998; Mossessova et al., 2003). A través de este mecanismo GBF1 es capaz de activar a las proteínas Arf1, Arf4 y Arf5 (Claude et al., 1999; Niu et al., 2005; Szul et al., 2005).

Además del dominio Sec7, GBF1 también posee 5 dominios más: un dominio de dimerización y unión a ciclofilina, llamado DCB (del inglés “dimerization and cyclophilin binding domain”), un dominio homólogo a Sec7 río arriba, llamado HUS (del inglés “homology

upstream of Sec7 domain”) y tres dominios río abajo de Sec7, llamados HDS1-3 (del inglés “homology downstream of Sec7 domain”) (Figura 6) (Anders y Jürgens, 2008; Kaczmarek et al., 2017). No se conoce por completo la función de los dominios no catalíticos de GBF1, sin embargo, se ha encontrado que la región DCB-HUS está implicada en interacciones intramoleculares e intermoleculares esenciales para la dimerización y la unión estable de este factor a las membranas (Bhatt et al., 2015; Mansour et al., 1998; Ramaen et al., 2007). Por otra parte, la afinidad del dominio HDS1 a ciertos lípidos de membrana, así como la importancia del dominio HDS3 para estabilizar la unión de GBF1 a las membranas, ha llevado a proponer que los dominios HDS podrían ser importantes para facilitar la unión de GBF1 con lípidos específicos de las membranas donde este factor ejerce sus funciones (Bouvet et al., 2013; Chen et al., 2017; Ellong et al., 2011; Meissner et al., 2018, 2016). Debido a esto, se ha propuesto que los dominios no catalíticos de GBF1 son importantes para dirigir y estabilizar la unión de este factor a membranas.

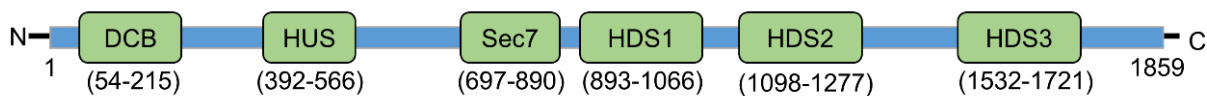


Figura 6.- Organización de la estructura de GBF1. Diagrama de la estructura primaria de GBF1 donde se puede observar la posición del dominio catalítico Sec7, así como la del dominio de dimerización y unión a ciclofilina (DCB) y los dominios homólogos ubicados río arriba (HUS) y río debajo (HDS1 a 3) de Sec7. Los números en paréntesis indican la posición de los aminoácidos para cada dominio.

Por otra parte, también se ha encontrado que los diferentes dominios de GBF1 permiten que este factor interactúe con numerosas proteínas celulares que participan en diferentes procesos, como en la función de las LDs y la mitocondria, así como en la endocitosis independiente de clatrina y la quimiotaxis de neutrófilos (Kaczmarek et al., 2017). Además de esto, se ha encontrado que GBF1 también es importante para el ciclo de replicación de diferentes virus de RNA y puede participar en diversos procesos como la replicación y transcripción de RNA, la formación de los complejos de replicación viral, la expresión de proteínas virales y el ensamblado de nuevos virus (Tabla 1). Si bien para muchos de estos virus se desconoce el mecanismo por el cual GBF1 puede ejercer estas funciones, se ha observado que en muchos casos la función de este factor va más allá de su papel como regulador del transporte vesicular (Martínez y Arias, 2020).

Tabla 1
 Papel de GBF1 en la replicación de virus de RNA.

Tipo de Genoma	Familia	Virus	Paso de la replicación viral asociado a GBF1	Referencia
No segmentado (+) ssRNA	<i>Flaviviridae</i>	DENV	Replicación de RNA Ensamblado del virus	(Hafirassou et al., 2017; Iglesias et al., 2015)
		TBEV	Ensamblado del virus	(Vonderstein et al., 2018)
		YFV	Liberación del virus	(Ferlin et al., 2018)
		KUN	Formación de complejos de replicación viral	(Mackenzie et al., 1999)
		CSFV	Replicación de RNA	(Liang et al., 2017)
		HCV	Replicación de RNA Expresión de proteínas Liberación del virus	(Goueslain et al., 2010; Tai et al., 2009; Zhang et al., 2012)
		Poliovirus	Replicación de RNA	(Belov et al., 2010, 2008; Belov y Ehrenfeld, 2007)
	<i>Picornaviridae</i>	CVA21	Replicación de RNA	(van der Linden et al., 2010)
		CVB3	Replicación de RNA	(Hsu et al., 2010; Lanke et al., 2009; van der Linden et al., 2010)
		CVB4	Replicación de RNA	(Ferlin et al., 2018)
		EV71	Replicación de RNA Expresión de proteínas	(Qin et al., 2014; van der Linden et al., 2010; Wang et al., 2014)
		HRV2	Replicación de RNA	(Dorobantu et al., 2015)
		HRV14	Replicación de RNA	(Dorobantu et al., 2015)
		<i>Togaviridae</i>	CHIKV	Replicación de RNA Expresión de proteínas
	SINV		Replicación de RNA Expresión de proteínas	(Ferlin et al., 2018; Molina et al., 2007)
	<i>Hepeviridae</i>	HEV	Replicación de RNA	(Farhat et al., 2018)
		MHV	Replicación de RNA	(Verheije et al., 2008)
<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV	Replicación de RNA Transcripción de RNA	(de Wilde et al., 2015; Knoops et al., 2010)	
	HCoV-229E	Replicación de RNA	(Ferlin et al., 2018)	

Tipo de Genoma	Familia	Virus	Paso de la replicación viral asociado a GBF1	Referencia
No segmentado (-) ssRNA	<i>Rhabdoviridae</i>	VSV	Replicación de RNA Transcripción de RNA Expresión de proteínas	(Panda et al., 2011)
	<i>Paramyxoviridae</i>	HPIV3	Expresión de proteínas	(Panda et al., 2011)
Segmentado (-) ssRNA	<i>Orthomyxoviridae</i>	IAV	Ensamblado del virus	(Sun et al., 2013; Watanabe et al., 2014; Yadav et al., 2016)
	<i>Arenaviridae</i>	LCMV	Expresión de proteínas	(Panda et al., 2011)

ssRNA, RNA de cadena sencilla (del inglés single strain RNA); DENV, virus del dengue (siglas de “dengue virus”); TBEV, virus de encefalitis transmitida por garrapatas (siglas de “tick-borne encephalitis virus”); YFV, virus de la fiebre amarilla (siglas de “yellow fever virus”); KUN, virus de Kunjin (siglas de “Kunjin virus”); CSFV, virus de la fiebre porcina clásica (siglas de “classical swine fever virus”); HCV, virus de la hepatitis C (siglas de “Hepatitis C virus”); CVA21, coxsackievirus A21; CVB3, coxsackievirus B3; CVB4, coxsackievirus B4; EV71, enterovirus 71; HRV2, rinovirus humano 2 (siglas de “human rhinovirus 2”); HRV14, rinovirus humano 14 (siglas de “human rhinovirus 14”); CHIKV, virus chikungunya (siglas de “chikungunya virus”); SINV, virus Sindbis (siglas de “Sindbis virus”); HEV, virus de la hepatitis E (siglas de “hepatitis E virus”); MHV, coronavirus de hepatitis de ratón (siglas de “MURINE hepatitis coronavirus”); SARS-CoV, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (siglas de “severe acute respiratory syndrome coronavirus”); HCoV-229E, coronavirus humano 229E (siglas de “human coronavirus 229E”); VSV, virus de la estomatitis vesicular (siglas de “vesicular stomatitis virus”); HPIV3, virus de parainfluenza tipo 3 (siglas de “human parainfluenza virus 3”); IAV, virus de influenza (siglas de “influenza virus”); LCMV, virus de la coriomeningitis linfocítica (siglas de “lymphocytic choriomeningitis virus”).

1.8. Gotas Lipídicas o LDs (del inglés “Lipid droplets”)

Las LDs son organelos celulares únicos formados por una zona hidrofóbica interna compuesta de lípidos neutros como esteres de colesterol y triacilgliceroles, la cual está rodeada por una monocapa de fosfolípidos, en donde se insertan una gran variedad de proteínas y enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos (Walther y Farese, 2012) (Figura 7).

Estos organelos se originan a partir de la acumulación progresiva de lípidos neutros entre la bicapa lipídica de la membrana del RE. Conforme las nuevas LDs se expanden, diferentes enzimas son reclutadas hacia la superficie de estos organelos para promover la síntesis de los fosfolípidos que formaran la superficie de estos organelos. Finalmente, cuando las LDs alcanzan su tamaño limite, estos organelos son liberados del RE como estructuras globulares libres, las cuales en algunos casos pueden permanecer estrechamente asociadas al RE (Pol et al., 2014).

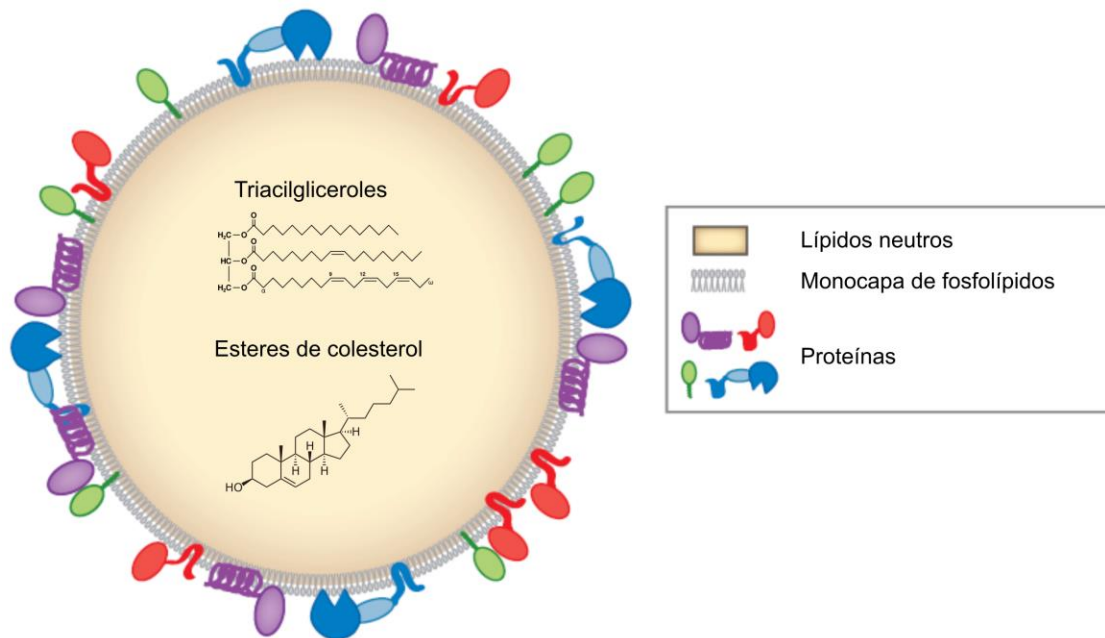


Figura 7.- Estructura de las gotas lipídicas o LDs. Diagrama de las LDs donde se puede observar la zona hidrofóbica interna compuesta de lípidos neutros (esteres de colesterol y triacilgliceroles), la cual está rodeada por una monocapa de fosfolípidos, en donde se insertan una gran variedad de proteínas (Tomado y modificado de Walther y Farese, 2012).

Por décadas, las LDs fueron consideradas como inclusiones pasivas de almacenamiento de lípidos; sin embargo, recientemente se ha encontrado que en este tipo de estructuras se localizan muchas de las enzimas involucradas en la síntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles, así como lipasas y reguladores lipolíticos. Debido a esto, se les ha llegado a considerar como organelos dinámicos con un papel esencial en la homeostasis de lípidos, los cuales pueden ser capaces de proveer sustratos tanto para la producción de energía en el metabolismo celular, como para la producción de moléculas derivadas de lípidos, como lipoproteínas, sales biliares, hormonas y para la síntesis de membranas. Además, pueden participar en el almacenamiento temporal de proteínas transmembranales no plegadas que posteriormente son degradadas en el proteosoma, así como en la respuesta de estrés en el RE y la glicosilación de proteínas (Pol et al., 2014; Walther y Farese, 2012; Wilfling et al., 2014). Se ha reportado que las LDs pueden también ser necesarias para la replicación de algunos virus, como el virus de la hepatitis C (“HCV” por sus siglas en inglés) y el virus del dengue (“DENV” por sus siglas en inglés), en los cuales las LDs son importantes para la replicación y el empaquetamiento del genoma viral, así como para el ensamblado de las nuevas partículas virales (McLauchlan, 2009; Samsa et al., 2009). De igual forma, también se ha encontrado que la replicación de rotavirus requiere de la participación de LDs, ya que se ha reportado que proteínas y lípidos de estos organelos pueden asociarse a los viroplasmos formados en las células infectadas por rotavirus, y que además la disrupción de LDs reduce la producción de la progenie viral (Cheung et al., 2010).

2. ANTECEDENTES

Debido a la alta complejidad de la morfogénesis de rotavirus, muchos de los factores y mecanismos moleculares que participan en este proceso continúan sin conocerse. Por un lado, dada la inherente afinidad de las proteínas estructurales de rotavirus a autoensamblarse y formar partículas aun en ausencia del genoma viral (Kim et al., 2002; Zeng et al., 1996), se ha propuesto que para la formación de partículas infecciosas se debe coordinar el empaquetado con la replicación del genoma dentro de los viroplasma.

Para lograr esta coordinación, los viroplasma deben no solamente reclutar a las proteínas estructurales, sino regular su interacción espacio-temporal. En este sentido se ha propuesto que los viroplasma tienen una organización intrínseca que permita coordinar la replicación del genoma con la morfogénesis del virus (Patton et al., 2006a).

El análisis de células infectadas por microscopía confocal ha sugerido que los viroplasma pudieran estar subdivididos en un dominio interior compuesto por las proteínas NSP2, NSP5, VP1 y VP2, y en un dominio exterior caracterizado por las proteínas VP6 y NSP4 rodeado de una zona discontinua rica en VP7 (Altenburg et al., 1980; González et al., 2000; López et al., 2005). No obstante, debido a que estas observaciones siempre han estado restringidas al bajo límite de resolución que se puede alcanzar con la microscopía de fluorescencia clásica y a la dificultad de realizar inmunomicroscopía electrónica para determinar la posición de más de una proteína viral, hasta el momento no ha sido posible determinar si en verdad existe una estructura organizacional de los viroplasma que permita coordinar la morfogénesis del virus.

Por otro lado, recientemente se describió que el sistema de transporte vesicular mediado por la maquinaria COPI/Arf1 también está relacionado estrechamente con la morfogénesis de rotavirus, ya que su inhibición por RNAi (Green y Pelkmans, 2016; Silva-Ayala et al., 2013), o por fármacos como Brefeldina A (BFA), que bloquean la activación de Arf1 mediada por el factor GBF1 (Beck et al., 2009; Hsu y Yang, 2009; Mossessova et al., 2003), disminuye significativamente la producción de virus infecciosos (Mirazimi et al., 1996).

En el transcurso de mi tesis de maestría demostré que además de BFA, el tratamiento de células infectadas con Golgicida A (GCA), otro inhibidor de la activación de Arf1 mediada por el factor GBF1 (Sáenz et al., 2009), también reduce significativamente la producción de progenie viral infecciosa. Asimismo, descubrí que esta reducción provocada por GCA y BFA se debe a un bloqueo en el ensamble de la capa externa del virus, ya que al purificar las partículas virales ensambladas en presencia de estos inhibidores, solamente se observó la presencia de DLPs (Martínez Guevara, 2015).

Además de estos efectos, también se observó que durante la infección por rotavirus en presencia de BFA y GCA se modifica la movilidad electroforética de las glicoproteínas de VP7 (disminución en su movilidad [aumento de peso]) y NSP4 (aumento de movilidad [disminución de peso]) (Martínez Guevara, 2015).

Se ha reportado que el cambio en la movilidad electroforética de NSP4 inducido por BFA se debe a una alteración en sus cadenas de carbohidratos, ya que al removerlas mediante la enzima endo-b-N-acetilglucosaminidasa H (Endo H), una enzima que libera los oligosacáridos con un alto contenido de manosa que se encuentren unidos a las proteínas residentes en el ER, NSP4 volvía a tener la misma movilidad electroforética (Mirazimi et al., 1996). Sin embargo, en el caso de VP7 aún se desconoce la causa de la alteración en su movilidad, para BFA se ha propuesto que esto pudiera ser debido a una modificación en el procesamiento post-traducciona l de la cadena de carbohidratos de esta glicoproteína, ya que VP7 adquiere resistencia al corte por endo H en presencia de este inhibidor (Mirazimi et al., 1996). Debido a que esta enzima es incapaz de remover oligosacáridos complejos, que normalmente se sintetizan en el cis-Golgi (Freeze, 1999), este resultado llevó a proponer que los carbohidratos de alta manosa de VP7 podrían estar siendo convertidos en carbohidratos complejos por enzimas del aparato de Golgi afectando su movilidad (Mirazimi et al., 1996).

Durante mi tesis de maestría encontré que tanto BFA como GCA también alteran la movilidad electroforética de una proteína mutante VP7 generada por la variante del rotavirus Sa11 (clona 28), la cual tiene mutado su único sitio de glicosilación (Asn69) y que por lo tanto no está glicosilada (Estes et al., 1982; Martínez Guevara, 2015). Estos resultados sugieren que el efecto de BFA y GCA sobre la proteína VP7 no parece estar ligado a una alteración en su

glicosilación. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la VP7 no glicosilada de cepa Sa11-CL28 pudiera estar siendo N-glicosilada en un sitio distinto a la Asn69, o bien O-glicosilada en presencia de estos inhibidores.

La contribución de estas modificaciones en VP7 y NSP4 al bloqueo en la producción de virus infeccioso de rotavirus es desconocida. En un principio la modificación de VP7 parecía la causa evidente del bloqueo en el ensamblado de la capa externa, ya que experimentos preliminares indicaron que la trimerización de VP7 requerida para la formación de TLPs parecía estar bloqueada en presencia de BFA o GCA (Martínez Guevara, 2015). Sin embargo, dado que la cepa Sa11-CL28 contiene una proteína NSP4 glicosilada como la que se encuentra en la cepa silvestre de Sa11 (Sa11wt) y que la producción de virus en ambas cepas fue sensible a los tratamientos con BFA o GCA (Martínez Guevara, 2015), no se puede descartar que la alteración en NSP4 también contribuya al bloqueo de los últimos pasos de la morfogénesis del virus.

Independientemente de estos factores, también se desconoce cuál es el mecanismo por el que la maquinaria COPI/Arf1 pudiera estar participando en el ensamblado de la capa externa de rotavirus. Considerando la estrecha relación del ciclo de replicación de rotavirus con RE y más recientemente con las LDs, surgen como posibles candidatos las funciones del complejo COPI/Arf1 en el transporte retrógrado Golgi-RE y/o en el transporte RE-LDs.

Por lo mencionado anteriormente, en el presente proyecto estudiamos el mecanismo a través del cual los componentes del complejo COPI/Arf1 afectan el ensamble de las proteínas de superficie VP4 y VP7 de rotavirus, así como el papel de los viroplasmos en la organización interna en sus componentes durante el ensamblado de nuevas partículas virales.

3. HIPOTESIS

La morfogénesis de rotavirus está relacionada con la correcta actividad del transporte vesicular mediado por COPI/Arf1 entre el Golgi y el RE o bien entre el RE y las LDs, el cual es necesario para el correcto procesamiento post-traducciona l de la proteína VP7 y/o NSP4. Asimismo, la morfogénesis de las partículas virales requiere de un arreglo organizado de las proteínas virales en los viroplasm as.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el papel de la maquinaria COPI/Arf1 en el ensamble de la capa externa de rotavirus y conocer si las proteínas virales se encuentran estructuralmente organizadas en los viroplasm as.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar si el bloqueo en el paso final de la morfogénesis de rotavirus, provocado por la inhibición de la actividad del complejo COPI/Arf1, se debe a:
 - 1.1. Un bloqueo en la gemación de DLPs hacia el RE.
 - 1.2. Un defecto en el procesamiento post-traducciona l de VP7.
 - 1.3. Una alteración en la localización intracelular de VP7.
 - 1.4. Una alteración en la función de NSP4.
2. Definir cuál (es) de las funciones asignadas al complejo COPI/Arf1 se requiere para el ensamble de la capa externa del virus.
 - 2.1. Evaluar si el transporte retrogrado Golgi-RE es importante para el ensamble de las proteínas de superficie de rotavirus.
 - 2.2. Determinar si la formación y función de LDs son importantes para la adquisición de las proteínas de capa externa del virus.
3. Analizar la organización nanoscópica de las proteínas virales asociadas a los viroplasm as de rotavirus.

5. METODOLOGÍA

5.1. Líneas celulares y cepas de virus

En este estudio se utilizaron las líneas celulares MA104 (ATCC:CRL-2378.1) y MA104/NSP5-EGFP (donadas por el Dr. Oscar Burrone del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología, Trieste, Italia) derivadas de epitelio renal de mono verde (*Cercopithecus aethiops*), así como la línea celular Hek293/T7 derivada de células embrionarias de riñón humano (donada por el Dr. Carlos Sandoval Jaime del Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México). Estas células se cultivaron en medio DMEM-advanced (Dubecco's modification of Eagle's minimal essential medium) (Gibco, México), suplementado con 5% V/V de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, México). Los cultivos se realizaron en una cabina de flujo laminar y fueron incubados a 37°C con 5% de CO₂.

Por otra parte, se utilizaron las cepas de rotavirus de simio RRV (G3P5[3]), SA11 (G3P5[2]) y SA11-CL28, G3P5[2]), así como la cepa bovina UK (G6P7[5]), porcina YM (G11P9[7]) y de humano 69M (G8P4[10]). Estos virus se propagaron en las células MA104 en medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma-Aldrich, México) sin SFB, para lo cual el inóculo viral se activó mediante incubación con 10 µg/ml de tripsina (1%) a 37°C por 30 min. El virus activado se adicionó sobre las células y se incubó por una hora a 37°C, después de ese tiempo se removió el inóculo, se adicionó MEM sin SFB y se incubó por 20 h a 37°C en 5% de CO₂. Las células infectadas junto con el medio de cultivo se congelaron y descongelaron dos veces con el fin de liberar tanto el virus intracelular como el adherido a las membranas. Posteriormente el lisado se centrifugó para retirar los restos celulares y el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -70°C. El virus infeccioso de los lisados virales se cuantificó por un ensayo de inmunoperoxidasa.

5.2. Anticuerpos y reactivos

En este trabajo se emplearon los anticuerpos primarios descritos en la tabla 2. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos de cabra anti-ratón Alexa Flúor 488 y de cabra anti-conejo Alexa Flúor 568 (Molecular Probes [Eugene, Oregon, USA]), así como los

anticuerpos de cabra anti-ratón y de cabra anti-conejo acoplados a la enzima peroxidasa (PerkinElmer Life Sciences [Boston, Massachusetts, USA]).

Tabla 2

Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Clonalidad	Especie	Origen
VP2 (3A8)	Monoclonal	Ratón	Dr. Harry B. Greenberg (Stanford University, Stanford, California, USA)
VP4 (2G4)	Monoclonal	Ratón	
VP6 (255/60)	Monoclonal	Ratón	
Monómero de VP7 (M60)	Monoclonal	Ratón	
Trímero de VP7 (mAb159)	Monoclonal	Ratón	
VP1	Policlonal	Ratón	Dr. Carlos F. Arias y Dra. Susana López (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos, México)
NSP2	Policlonal	Ratón	
NSP2	Policlonal	Conejo	
NSP5	Policlonal	Conejo	
NSP4	Policlonal	Conejo	
Vimentina	Policlonal	Conejo	
GBF1	Monoclonal	Ratón	BD Transduction Laboratories (San Jose, California, USA)
Arf1	Monoclonal	Ratón	Novus Biologicals (Centennial, Colorado, USA)
FASN	Policlonal	Conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
ATGL	Policlonal	Conejo	Proteintech (Rosemont, Illinois, USA)
DGAT1	Monoclonal	Conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
GFP	Monoclonal	Ratón	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)

Por otro lado, se emplearon los inhibidores farmacológicos del Transporte COPI/Arf1: Brefeldina A (BFA) (Sigma-Aldrich [Catalogo: B7651]) y Golgicida A (GCA (Calbiochem [Catalogo: 345862]) disueltos en etanol absoluto y dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente. Además, se emplearon los inhibidores del metabolismo de lípidos: C75 (Sigma-Aldrich [Catalogo: C5490]), TOFA (Sigma-Aldrich [Catalogo: T6575]), DEUP (Sigma-Aldrich [Catalogo: D7692]) y Etomoxir (Sigma-Aldrich [Catalogo: E1905]), disueltos en DMSO.

Finalmente para la tinción de lípidos neutros se empleó el colorante Bodipy 493/503 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA [Catalogo: D3922]) diluido en DMSO.

5.3. siRNAs y plásmidos

Los siRNAs (del inglés “small interfering RNA”) dirigidos contra los genes de GBF1, Arf1, FASN, DGAT1 y AGTL, así como el siRNA irrelevante dirigido contra el gen de luciferasa (utilizado como control negativo), se adquirieron de GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, Colorado, USA) como un “SMART pool” constituido por una mezcla de 4 siRNAs diseñados contra diferentes regiones de cada gen, de modo que se pudiera tener un efecto sinérgico que permitiera un eficiente silenciamiento de cada uno de los genes blanco.

Los plásmidos pcDNA3-VP7 (VP7 con glicosilación), pcDNA3-VP7-noNg (VP7 sin glicosilación) y pcDNA3-NSP4 fueron donados por el Dr. Oscar Burrone del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (Trieste, Italia). Por otra parte, los plásmidos pCAG-D1R y pCAG-D12L que codifican para las dos subunidades de la guanililtransferasa del virus vaccinia, se obtuvieron del Dr. Takeshi Kobayashi (Osaka University, Osaka, Japan) (plásmidos Addgene #89160 y #89161, respectivamente). El plásmido mTurquoise2-RE se obtuvo de Dr. Dorus Gadella (plásmido Addgene #36204)

Todos los plásmidos de GBF1 utilizados en este estudio fueron donados por la Dra. Elizabeth Sztul del Departamento de Biología celular de la Universidad de Alabama en Birmingham (Birmingham, Alabama, USA).

5.4. Análisis de células infectadas por microscopía electrónica de transmisión

Células MA104 crecidas en discos de zafiro, se infectaron con RRV a una multiplicidad de infección (“MOI” por sus siglas en inglés) de 250 unidades formadoras de viroplasma/ml en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10 µM). A las 6 hpi, las células se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído en 100 mM de amortiguador de fosfato de Na/K por toda una noche a 4 °C. Posteriormente, las células se post-fijaron con 1% de tetraóxido de osmio en 100 mM de amortiguador de fosfato de Na/K por 1h a 4 °C y se deshidrataron con diluciones seriadas de etanol y acetona, después de lo cual las muestras se sumergieron en resina Epon. Finalmente se realizaron cortes ultrafinos (60 a 80 nm) de las muestras, los cuales se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las imágenes de los cortes de las muestras se adquirieron con un microscopio electrónico de transmisión (CM12, Philips, Eindhoven, Holanda) equipado con un cámara CCD (del inglés “charge-coupled device”) (Ultrascan 1000, Gatan, Pleasanton, CA, USA).

5.5. Transfección de siRNAs y plásmidos

La transfección de siRNAs se realizó utilizando Oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mediante el método de transfección reversa descrito anteriormente por (Gutierrez et al., 2010). Por otra parte, los diferentes plásmidos se transfectaron en las células utilizando lipofectamina 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.6. Tratamientos con endoglicosidasas y fosfatasa

Células MA104 crecidas en placas de 12 pozos se transfectaron con el plásmido pcDNA3-VP7 y posteriormente se trataron con BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10 µM) a 1 hora post-transfección (hpt). A las 24 hpt, las células se lisaron en un amortiguador de Tris HCl (125 mM, pH 6.8) adicionado con 7.6 % P/V de SDS. Finalmente, los extractos celulares se trataron con la enzima Endo H o la enzima Péptido: N-Glucosidasa F (PNGasa F) (Life Technologies (Carlsbad, California, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Del mismo modo, para analizar una posible O-glicosilación o fosforilación, los lisados obtenidos se trataron con una mezcla de O-glicosidasas o una λ-fosfatasa (Life Technologies (Carlsbad, California, USA), las cuales fueron utilizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.7. Análisis de espectrometría de masas (EM)

Monocapas de células MA104 infectadas por 9 h con RRV en presencia o ausencia de BFA se lavaron con amortiguador de fosfato salino 1x (“PBS” por sus siglas en inglés). Las células se despegaron en PBS 1x con ayuda de un gendarme y se pasaron a un tubo falcón. Las células se centrifugaron a 6000 g y el paquete celular obtenido se disolvió en 1ml de solución de lisis (Tritón X-100 1%, SDS 1%, dioxicolato de sodio 1% y mezcla de inhibidores de proteasas 1x [complete]), finalmente el lisado se volvió a centrifugar a 6000 g para retirar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se mezcló con 250µl de Concanavalina A (ConA)-sefarosa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante, posteriormente la muestra se

centrifugó para recuperar la ConA-sefarosa unida a las diferentes glicoproteínas y se lavó 3 veces con la solución de lisis descrita anteriormente. Finalmente, para recuperar las glicoproteínas unidas, se disolvió la ConA-sefarosa en buffer laemmli 1x (Laemmli, 1970) y la muestra se hirvió durante 5 min.

Las glicoproteínas enriquecidas se separaron en un gel de SDS-PAGE, el cual se tiñó con azul de coomassie. Las bandas correspondientes a VP7 se cortaron y enviaron para su análisis por espectrometría de masas (EM) en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas, IBT-UNAM. En este análisis, las proteínas (reducidas con DTT y alquiladas con iodoacetamida) se trataron en primera instancia con PNGasa F para retirar los carbohidratos unidos y posteriormente se digirieron con una mezcla de tripsina y endoproteinasa GluC. Los péptidos resultantes se desalaron con una columna Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y se aplicaron en un sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray.

5.8. Ensayos de infectividad de rotavirus

Monocapas de células MA104 crecidas en placas de cultivo de 96 pozos se lavaron con MEM e infectaron con 1000 unidades formadoras de focos (UFF) de rotavirus por pozo, durante una hora a 37°C (El virus se activó previamente con tripsina, como se describió anteriormente). Al término del tiempo de infección, las células se lavaron una vez con MEM y se incubaron en medio MEM fresco a 37°C con 5% de CO₂ por 12 h. Después del tiempo de incubación, las células se fijaron con acetona al 80% V/V por 20 min a temperatura ambiente y se procesaron para determinar las UFF/pozo mediante un ensayo de inmunoperoxidasa.

5.9. Cuantificación viral por ensayo de inmunoperoxidasa

Para este procedimiento, las células se incubaron con el anticuerpo anti-TLPs (dilución 1:3000) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-conejo peroxidasa (dilución 1:3000). La actividad de la peroxidasa se reveló con amino-etil-carbazol (AEC) (1 mg/ml) en amortiguador de acetato de sodio (50mM), pH 5.0 y 0.04% de H₂O₂. El conteo de las células infectadas o UFF se realizó con una amplificación 20X en un microscopio invertido (Leika, Alemania), recorriendo los campos contenidos a lo largo de una banda central del pozo.

5.10. Determinación de progenie viral infecciosa de rotavirus

Para este ensayo, mono capas de células crecidas en una placa de cultivo de 48 pozos se trataron con los distintos inhibidores o se transfectaron con siRNAs. Posteriormente las células se infectaron con los distintos virus a una MOI de 5 y se incubaron por 12 h a 37°C con 5% de CO₂. Al final del periodo de incubación, las células junto con el medio de cultivo se congelaron y descongelaron dos veces, después de lo cual el lisado se pasó a tubos estériles y se centrifugó para retirar los restos celulares. Finalmente, las UFF/ml de la progenie infecciosa viral producida se determinaron por medio de un ensayo en cual se infectaron monocapas de células crecidas en placas de 96 pozos con diluciones seriadas de los lisados virales. Posteriormente, las células infectadas se revelaron y cuantificaron con ensayo de inmunoperoxidasa como descrito anteriormente (ver sección de anterior).

5.11. Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) del Kit TOX-7 (Sigma-Aldrich [San Luis, Misuri, USA]). Para este procedimiento, las células tratadas en las condiciones indicadas se incubaron por 12 h en MEM sin SFB. Al termino de este tiempo, se retiró el medio de cultivo extracelular de cada condición y las células se incubaron con 50 µl de la solución de lisis provista por el kit, por 45 min a 37°C. Posteriormente, para la medición de la LDH, se agregaron 50 µl de una mezcla formada por ácido láctico (sustrato), un colorante tipo tetrazolio y el cofactor NAD⁺, a ya sea 50 µl del lisado celular (diluido 1:10 en MEM sin SFB) (LDH citoplasmática) o 50 µl del medio extracelular (LDH liberada). Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con 15 µl de HCl 0.1N y la absorbancia (Abs) de las muestras fue leída a 490 y 610 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemania).

La LDH reduce el cofactor NAD⁺ para producir NADH, el cual posteriormente convierte de forma estequiométrica al colorante de tipo tetrazolio en un compuesto coloreado cuya concentración puede medirse a 490 nm. Debido a que la medición a 610 nm puede detectar parte de la señal de fondo de las muestras, a los valores de las absorbancias obtenidas a 490 nm se les sustrajo el valor de las absorbancias a 610 nm y los valores obtenidos fueron utilizados para la determinación de la cantidad de LDH liberada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de LDH liberada} = \left(\frac{\text{Abs del medio extracelular}}{\text{Abs del medio extracelular} + \text{Abs del lisado de células}} \right) \times 100$$

5.12. Análisis de proteínas por Western blot

Para este ensayo, las monocapas de células crecidas en las distintas condiciones según se indique, se lisaron con amortiguador Laemmli 1x (Laemmli, 1970) adicionado con 5% de β -mercaptoetanol. Posteriormente, el lisado se desnaturalizó por 5 min en agua hirviendo y se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana Immobilon NC (Millipore [Burlington, Massachusetts, USA]) en una cámara húmeda utilizando el amortiguador CAPS 1x (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico) adicionado con 10% de metanol. La transferencia se realizó con una corriente constante de 150 mA por 1 h.

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon 1h a temperatura ambiente con 5% de leche baja en grasa Carnation (Nestle) diluida en PBS 1x. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS 1x, adicionado con 0.1% de Tween 20, toda una noche a 4°C en agitación. Al final de este periodo, las membranas se lavaron tres veces con la solución de PBS-Tween 0.1% y posteriormente se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la enzima peroxidasa. Finalmente, las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Lightning-ECL (Perkin-Elmer [Waltham, Massachusetts, USA]), esto de acuerdo a las instrucciones del proveedor y empleando la película fotográfica Kodak Medical X-Ray film (CARESTREAM [Zapopan, Jalisco, México]).

5.13. Ensayos de pulso y caza

Para el marcaje de proteínas sintetizadas *de novo* con ^{35}S , células MA104 crecidas en una placa de 48 pozos se trataron de acuerdo con las condiciones indicadas y se incubaron por 7 h en medio MEM sin SFB 37 °C. Al término de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron por 30min en medio MEM libre de metionina (Met) y se sometieron a un pulso de 30 min con 25 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -Met/Cys (Easy Tag Express [^{35}S]Met/Cys [Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA]); la marca se retiró y las células se lavaron tres veces con MEM sin SFB. Las células se incubaron en MEM sin SFB de acuerdo a las condiciones indicadas por 2h y

posteriormente las proteínas se cosecharon con el amortiguador Laemmli 1x (Laemmli, 1970). Finalmente, las proteínas marcadas metabólicamente se separaron en un gel de SDS-PAGE y se revelaron por autoradiografía.

Por otra parte, para el marcaje de glicoproteínas con [³H]manosa, células MA104 crecidas en las condiciones deseadas se incubaron por 6 h en MEM sin SFB. Al término de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con medio MEM libre de glucosa por 30 min. Posteriormente las células se sometieron a un pulso de 1.5 h con 200 µCi/ml de manosa-D-[2-³H(N)] (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA). Pasado este tiempo se retiró la marca radioactiva y las células se lavaron con MEM sin SFB e incubaron en las condiciones indicadas por 2 h. Las células fueron cosechadas en amortiguador Laemmli 1x (Laemmli, 1970). Finalmente, las glicoproteínas marcadas metabólicamente fueron separadas en un gel de SDS-PAGE y reveladas por Fluorografía.

5.14. Ensayo de inmunofluorescencia

Células MA104 crecidas a confluencia en cubreobjetos de vidrio previamente esterilizados con UV por 1200 s en un UV crosslinker (Spectrolinker™ XL-1000, Spectronics Corporation, Estados Unidos), se infectaron con rotavirus a una MOI de 1 durante 1 h a 37°C. A las 6 hpi, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 20 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron por 15 min a 37°C con 0.5% V/V de Tritón X-100 diluido en amortiguador de bloqueo (1% P/V de albumina sérica bovina (BSA) diluida en PBS 1x adicionado con 50 mM de NH₄Cl).

Posteriormente, las células se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios respectivos, los cuales se diluyeron en el amortiguador de bloqueo descrito anteriormente (ver párrafo previo), consecutivamente las monocapas se lavaron 4 veces con PBS 1x adicionado con 50 mM de NH₄Cl y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Flúor 488 (dilución 1:500) o Alexa Flúor 568 (dilución 1:500) por 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente, las monocapas de células se incubaron con DAPI (30 nM) y los cubreobjetos se montaron con CitiFluor AF1 antifadent (Electron Microscopy Sciences [Emsdiasum, Hatfield, Pensilvania, USA]) en portaobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio confocal

invertido de disco giratorio 3I Marianas (Zeiss Observer Z.1) acoplado a una cámara digital EMCCD (del inglés “Electron multiplying charge coupled device”) Andor Ixon y las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa ImageJ 1.52n.

5.15. Ensayo de microscopía de súper-resolución (MSR)

Las monocapas de células tratadas o no, según se indique, se procesaron para inmunofluorescencia como se describió anteriormente. Sin embargo, los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Flúor 488 o Alexa Flúor 568 se utilizaron a una dilución de 1:5000. Finalmente, los cubreobjetos de las muestras se montaron en el centro de un portaobjetos de vidrio en 5 μ l de solución STORM (1.5% P/V de glucosa oxidasa adicionada con 100 mM de β -mercaptoetanol) (Dempsey et al., 2011; Heilemann et al., 2009).

Para la reconstrucción de imágenes de súper-resolución (ISR), se adquirieron videos de los viroplasmas de rotavirus mediante un microscopio invertido Olympus IX-81 configurado para excitación de fluorescencia de reflexión total interna (“TIRF” por sus siglas en inglés) (Olympus, cell TIRFm Illuminator), el cual estuvo acoplado a una cámara EMCCD andor iXon 897. Para este microscopio se estableció un ángulo crítico de tal forma que el campo evanescente tuviera una penetración de \sim 200 nm de profundidad y cada video contó con 300 imágenes tomadas a un intervalo de 100 ms.

Finalmente, los videos fueron analizados con el algoritmo 3B (del inglés “Bayesian Blinking and Bleaching”) considerando un tamaño de pixel de 100 nm y una anchura a media altura (“FWHM” por sus siglas en ingles) de la función de dispersión de 270 nm. Todos los demás parámetros para el análisis se establecieron usando los valores predeterminados del algoritmo. Tras 200 iteraciones del procesamiento del algoritmo 3B, los datos obtenidos fueron utilizados para crear las ISR finales utilizando el plugin de ImageJ “3B analysis”.

5.16. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney utilizando el programa R 3.6.0. Además, mediante este mismo programa se confirmó la homogeneidad de varianzas por una prueba de Fligner Killeen.

6. RESULTADOS

6.1. BFA y GCA no bloquean la gemación del DLPs hacia el interior del RE.

Durante el transcurso de mi tesis de maestría encontré que la presencia de BFA y GCA reducía significativamente la producción de progenie viral infecciosa al bloquear el ensamble de la capa externa del virus, ya que, al purificar las partículas virales ensambladas en presencia de estos inhibidores, solamente se observó la presencia de DLPs (Martínez Guevara, 2015). Para conocer si este bloqueo en el ensamblado de TLPs podría deberse a la inhibición en la gemación de DLPs hacia el RE, se analizó este proceso por medio de microscopía electrónica en cortes ultra finos (60-80 nm) de células MA104 infectadas con el rotavirus rhesus (RRV) en presencia o ausencia de BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10 µM).

En la ausencia de inhibidores, se pudo observar como se esperaba, la estructura electrodensa típica de los viroplasmos, los cuales se encontraron en estrecha asociación con membranas del RE (Figura 8a). Además, se lograron observar partículas virales, presumiblemente DLPs gemando hacia el interior del lumen del RE para producir las partículas intermediarias envueltas. Del mismo modo, dentro del RE también se observaron una gran cantidad de partículas virales carentes de membrana, las cuales tuvieron la morfología de las TLPs finales de rotavirus, confirmando que el proceso de maduración de las partículas envueltas ocurrió como se ha descrito previamente (Figura 8a).

Cuando se analizaron las células tratadas con BFA o GCA, se encontró que ambos inhibidores del transporte intracelular promovieron un aumento en el tamaño de las membranas del RE asociadas con los viroplasmos de rotavirus (Figura 8b y 8c). Asimismo, se observó claramente que las DLPs formadas en presencia de estos inhibidores fueron capaces de gemar hacia el interior de este organelo y adquirir la capa transitoria de lípidos formando los intermediarios envueltos del virus, (Figura 8b y 8c). Sin embargo, a diferencia de las condiciones control, en las células tratadas con BFA o GCA, los intermediarios envueltos se acumularon en el interior del RE y no fue posible detectar partículas carentes de membrana (TLPs) dentro del RE, cuando menos de manera evidente.

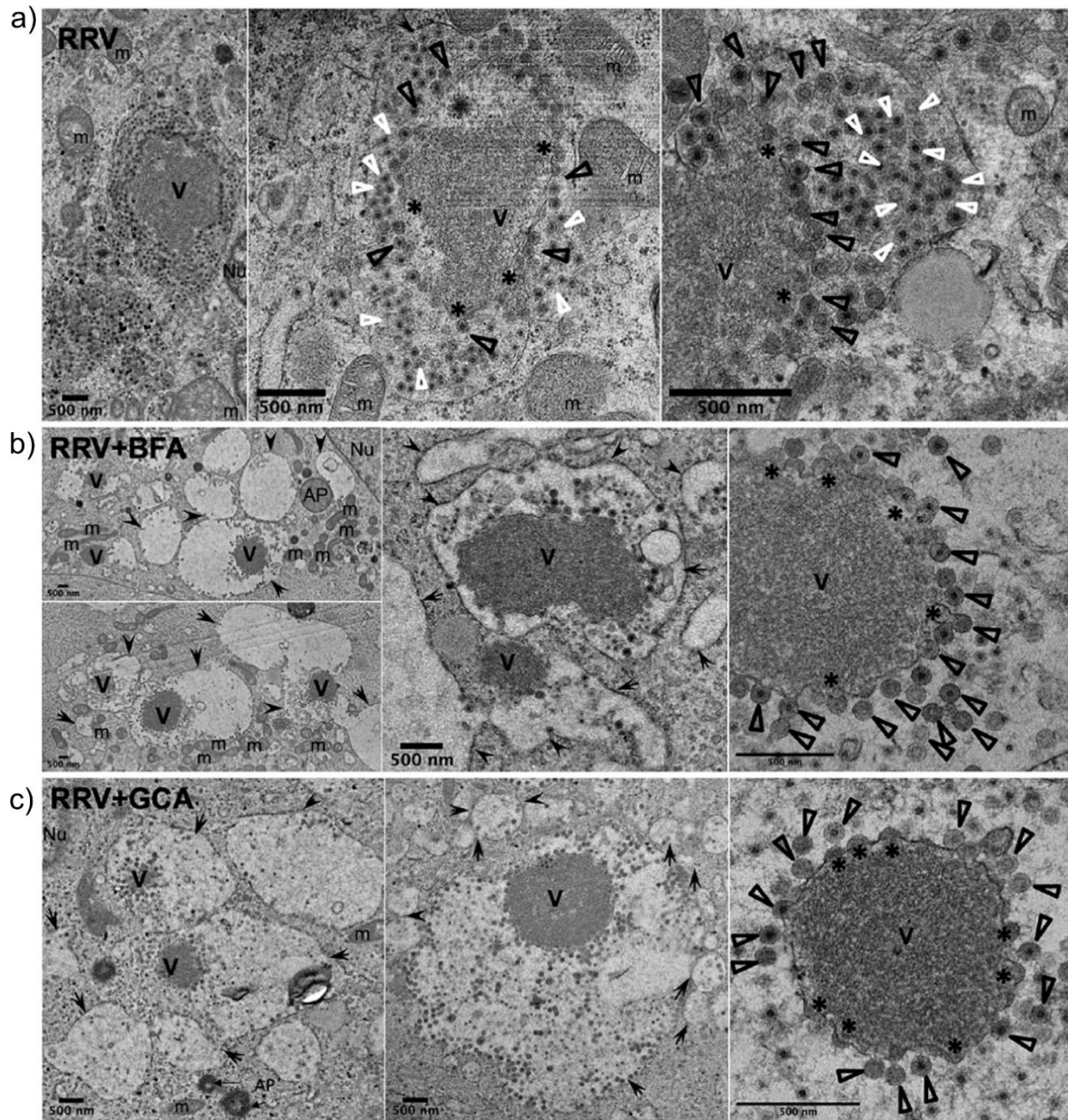


Figura 8.- BFA y GCA no bloquean la gemación de partículas virales hacia el RE. Células MA104 no tratadas (a) o tratadas con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de BFA (b) o 10 μM de GCA (c), fueron infectadas por 1h con RRV utilizando 250 UFV/célula. Al término de este tiempo, las células se lavaron para retirar el virus no internalizado y se añadió medio fresco con o sin los inhibidores. A las 6 hpi, las células fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica de transmisión (ver Metodología). Las flechas en color negro indican las membranas del RE que sufrieron un aumento de tamaño en presencia de BFA o GCA. Las puntas de flecha vacías señalan las TLPs (blanco) y DLPs (negro) dentro del RE. Los asteriscos indican los sitios de gemación de las DLPs. Nu, núcleo; m, mitocondria; AP, autofagosoma; V, viroplasma. La barra de escala corresponde a 500 nm.

En conjunto estos resultados indican que BFA y GCA bloquean la morfogénesis de rotavirus al inhibir el paso de maduración de las partículas intermediarias envueltas hacia TLPs, de modo que las proteínas de capa externa VP7 y VP4 no pueden ensamblarse sobre la partícula.

Si bien los factores involucrados en esta etapa de la morfogénesis no están muy bien definidos, se ha propuesto que el ensamblado de VP7 sobre la partícula viral permite remover la capa de lípidos de las partículas intermediarias. Tomando en cuenta esta propuesta, la alteración en la movilidad electroforética de la glicoproteína de VP7 inducida por presencia de BFA y GCA (Martínez Guevara, 2015; Mirazimi et al., 1996), parece surgir como una posible explicación del bloqueo en el ensamblado de la capa externa.

6.2. La modificación de VP7 inducida por BFA y GCA no está relacionada con una N- u O-glicosilación ni con una fosforilación.

Como se mencionó anteriormente, si bien la modificación que VP7 sufre durante la inhibición del transporte COPI/Arf1 parece ser la razón principal del bloqueo en la producción de virus infeccioso, aún se desconoce la causa de esta alteración en su movilidad. Para BFA se ha propuesto que esto pudiera ser debido a una modificación en el procesamiento post-traducciona l de la cadena de carbohidratos de esta glicoproteína (Mirazimi et al., 1996).

Debido a esto, para evaluar la contribución de los oligosacáridos al aumento inducido por BFA y GCA en el peso molecular aparente de VP7, se caracterizó la movilidad electroforética de esta proteína después del tratamiento con diferentes glicosidasas para retirar los posibles carbohidratos unidos por N- u O-glicosilación, de modo que si los carbohidratos fuesen la causa del cambio en la movilidad de VP7 su remoción debería ser suficiente para devolver a esta proteína a su movilidad electroforética normal.

Para este análisis, células MA104 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3-VP7, el cual codifica para la proteína VP7 de RRV, a 1 hpt las células se trataron con BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10 µM). Posteriormente, a las 24 hpt las células se lisaron, y el lisado obtenido fue tratado con la enzima Endo H, que remueve carbohidratos sencillos de alta manosa unidos por N-glicosilación, o con la enzima PNGasa F, la cual puede cortar tanto carbohidratos sencillos como complejos unidos a la proteína por N-glicosilación (Freeze, 1999). De manera paralela, los lisados se trataron con una mezcla de O-glicosidasas para retirar cualquier cadena de carbohidratos que pudiese estar unida por O-glicosilación a VP7. Después de estos tratamientos los lisados se sometieron a un análisis tipo western blot utilizando un anticuerpo específico contra VP7 (Pérez et al., 2005).

Mediante este ensayo, se encontró que, al igual que en la infección con rotavirus, la proteína VP7 de RRV expresada de manera heteróloga también disminuyó su movilidad electroforética (aumento de peso) en las células tratadas con BFA o GCA en comparación a la VP7 de la condición control (ausencia de inhibidores) (Martínez Guevara, 2015) (Figura 9a y 9b).

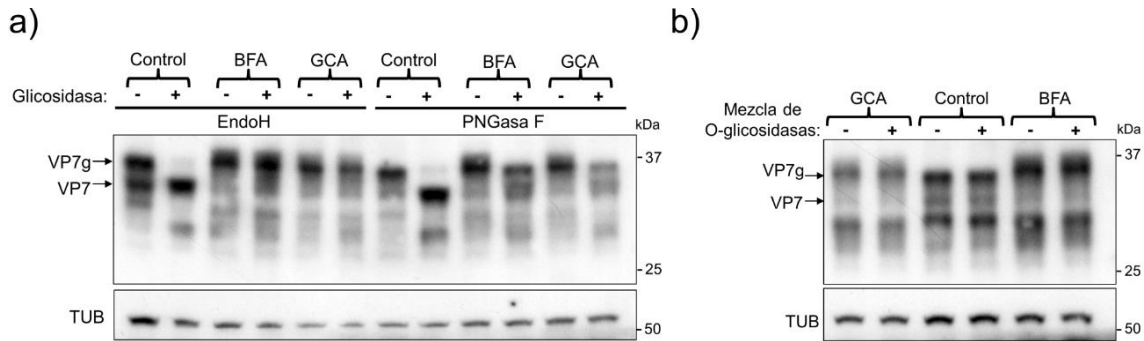


Figura 9.- El cambio en la movilidad electroforética de VP7 inducida por BFA y GCA no está relacionada con una N- u O-glicosilación. Western blot representativo de los lisados celulares tratados con las enzimas indicadas, en donde la expresión de la proteína VP7 se detectó con un anticuerpo específico. La posición de la proteína VP7 glicosilada (VP7g) y no glicosilada (VP7) se indica a la izquierda. Los pesos moleculares se indican a la derecha. La proteína tubulina (TUB) detectada con un anticuerpo específico se utilizó como control de carga.

Del mismo modo, como se reportó anteriormente (Mirazimi et al., 1996), se encontró que la proteína VP7 se vuelve resistente a la actividad de la Endo H cuando las células son tratadas con BFA. Ya que mientras en las condiciones control el corte con Endo H provocó un aumento en la movilidad de VP7 (disminución de tamaño), cuando las células fueron tratadas con BFA, esta enzima no alteró la movilidad electroforética de VP7 (Figura 9a). De manera interesante, este mismo efecto también se observó para el caso de la VP7 producida en presencia de GCA, indicando que ambos inhibidores parecen inducir la misma modificación en VP7 (Figura 9a).

Por otro lado, cuando se analizó el efecto de la PNGasa F sobre la movilidad de VP7, se encontró que esta enzima induce un aumento en la movilidad de esta proteína (disminución de tamaño) en ausencia de los inhibidores. Sin embargo, la proteína VP7 producida en presencia de BFA o GCA mostró ser parcialmente resistente al tratamiento con esta enzima, ya que se observó solo un ligero aumento en la movilidad de VP7 (Figura 9a). Asimismo, la movilidad de la proteína VP7 producida en presencia de BFA y GCA también demostró ser resistente al tratamiento con una mezcla de O-glicosidasas (Figura 9b).

Por otro lado, dada la gran importancia que el proceso de fosforilación en el plegamiento, la función y la interacción de muchas proteínas celulares y virales (Keating y Striker, 2012; Nishi et al., 2011), también se evaluó si los tratamientos con BFA o GCA pudiesen inducir la fosforilación de VP7 y con ello alterar su función. Para estos ensayos, los lisados de células transfectadas con el vector de expresión de pcDNA3-VP7 descritos anteriormente fueron sometidos a un tratamiento con una λ -fosfatasa, para retirar cualquier fosforilación de la proteína. De esta forma se descubrió que tanto en las condiciones control como en presencia de BFA o GCA, la movilidad de VP7 es resistente al tratamiento de la fosfatasa (Figura 10).

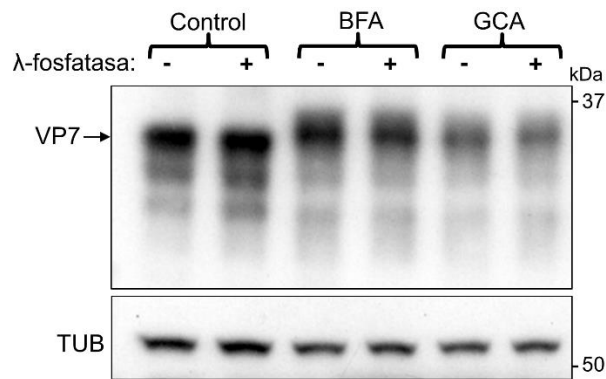


Figura 10.- La movilidad electroforética de VP7 inducida por BFA y GCA no está relacionada con una fosforilación. Western blot representativo de los lisados celulares tratados con una λ -fosfatasa, en donde la expresión de la proteína VP7 se detectó con un anticuerpo específico. La posición de VP7 se indica a la izquierda y los pesos moleculares se indican a la derecha. La proteína tubulina (TUB) detectada con un anticuerpo específico se utilizó como control de carga.

Dados estos resultados y para conocer de forma más precisa cual es el tipo de modificación que sufre VP7 durante los tratamientos con BFA o GCA, se optó por analizar esta proteína por espectrometría de masas (EM).

Para este análisis se realizó un enriquecimiento de las glicoproteínas producidas en células infectadas en ausencia o presencia de BFA, por afinidad a concanavalina A-sefarosa, la cual es una lectina que puede unirse a cadenas de carbohidratos ricas en residuos de manosa y glucosa (Goldstein y Poretz, 1986). Posteriormente las muestras enriquecidas en glicoproteínas fueron analizadas mediante SDS-PAGE. A partir de estos geles se cortaron las bandas correspondientes a VP7, que fueron enviadas para su análisis por EM en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas, IBT-UNAM.

Mediante este método fue posible cubrir gran parte de la secuencia total de VP7 (Figura 11, color verde); sin embargo, ninguno de los péptidos identificados mostró alguna diferencia entre la condición control y el tratamiento con BFA. Desafortunadamente no se pudo cubrir completamente la secuencia de la proteína producida en presencia de las drogas por la cantidad limitada que se obtuvieron, en al menos tres intentos diferentes de EM.

H1			H2	
MYGIEYTTVL	TFLISLILLN	YILKSLTRMM	DFIYRFLFI	VVILSPLLKA
QNYGINLPIT	GSMdTAYANs	TQEETFLTST	LCLYYPTEAA	TEINDNSWKD
TLSQLFLTKG	WPTGSVYFKE	YTDIASFSVD	PQLYCDYNVV	LMKYDATALQL
DMSLADLIL	NEWLCNPMDI	TLYYYQQTDE	ANKWISMGSS	CTIKVCPLNT
QTLGIGCLTT	DTATFEEVAT	AEKLVITDVV	DGVNHKLDVT	TATCTIRNCK
KLGPRENVAV	IQVGGSDVLD	ITADPTTAPQ	TERMMRINWK	KWWQVFYTVV
DYVNQIIQAM	SKRSRSLNSA	AFYYRI		

Figura 11.- Cobertura de la secuencia de VP7 obtenida por EM. Secuencia de aminoácidos de la proteína VP7 donde los péptidos identificados por EM están marcados en color verde, la secuencia del péptido señal removido contra-diccionalmente de VP7 se indica en color cian y el sitio de N-glicosilación (Asn69) está señalado en color rojo. Las posiciones de las zonas hidrofóbicas 1 y 2 se indican en los recuadros amarillos.

En otra aproximación para determinar el tipo de modificación que sufre esta proteína en presencia de estas drogas, se optó por evaluar el efecto de BFA sobre la movilidad electroforética de diferentes VP7 provenientes de distintos serotipos G de rotavirus, de modo que se pudiese identificar si algún serotipo G fuese resistente a la acción de BFA, a partir del cual se lograra revelar el posible sitio de modificación de esta proteína.

De este modo, se eligieron las cepas UK (origen bovino, G6P7[5]), YM (origen porcino, G11P9[7]) y 69M (origen humano, G8P4[10]), las cuales pertenecen a serotipos G distintos de la cepa RRV (origen de simio, G3P5[3]). Estos virus fueron utilizados para infectar células MA104 a una MOI de 5 en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml) por 6.5 h. Después de este tiempo las células fueron sometidas a un ensayo de pulso y caza con [³H]manosa (ver Metodología). Finalmente, las glicoproteínas marcadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y fluorografía.

Se encontró que, al igual que en reportes previos (Martínez Guevara, 2015; Mirazimi et al., 1996), la proteína VP7 de RRV (utilizada como control positivo) mostró una disminución en su migración cuando las células fueron tratadas con BFA (Figura 12a). De forma interesante, este mismo efecto también se observó para las demás proteínas VP7 de los virus 69M, YM y UK (Figura 12a), las cuales retardaron su migración en presencia de este fármaco.

Asimismo, dado que este ensayo permite además observar la marca de manosa incorporada en la glicoproteína NSP4 (Figura 12a), también fue posible observar que independientemente de la cepa viral analizada y a diferencia de la proteína VP7, la proteína NSP4 sufre un aumento en su movilidad electroforética cuando se sintetiza en presencia de BFA (Figura 12a).

Para conocer si la producción de virus infeccioso de alguno de estos serotipos pudiese ser resistente al tratamiento con BFA, se comparó la producción de progenie viral de los distintos serotipos de rotavirus en presencia o ausencia de este inhibidor. Para este ensayo, las células MA104 fueron infectadas en presencia o ausencia de BFA (2.5 µg/ml) con las diferentes cepas de rotavirus a una MOI de 5 por 1 h. Al término de este tiempo, las células se lavaron para retirar el virus no adsorbido y estas fueron incubadas en medio fresco en presencia o ausencia de BFA. A las 12 hpi, se colectaron las células y se determinó la producción de virus infeccioso por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa.

Mediante este ensayo se encontró que el tratamiento con BFA redujo significativamente la producción de virus infeccioso de las distintas cepas de rotavirus analizadas (Figura 12b). Estos resultados indican que los efectos de inhibición del transporte sobre la replicación de rotavirus son independientes de la cepa viral.

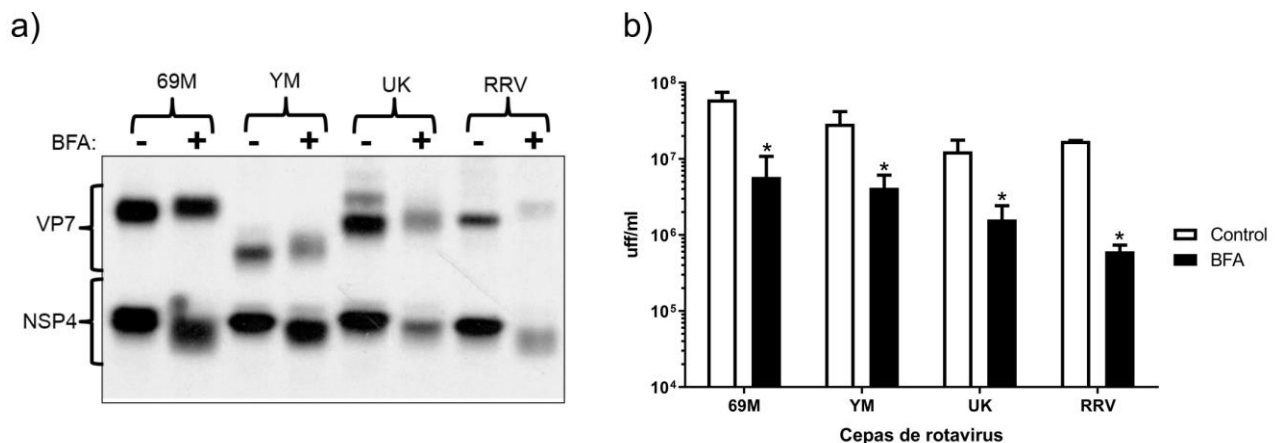


Figura 12.- BFA altera la movilidad de VP7 y NSP4 e induce una reducción en la replicación viral independientemente de la cepa de rotavirus evaluada. a) Fluorografía representativa de lisados de células MA104 infectadas con las cepas de rotavirus indicadas (MOI de 5) en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml). b) Progenie viral producida, en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml), de las cepas de rotavirus indicadas. Los datos representan los porcentajes de progenie viral (virus infeccioso), tomando como el 100% la progenie viral producida en la condición control (ausencia de BFA). Las barras representan el promedio ± la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos realizados por duplicado. *, P<0.05.

6.3. Los tratamientos con BFA y GCA inhiben la trimerización de VP7.

Experimentos preliminares realizados durante mi proyecto de maestría sugirieron que la maquinaria COPI/Arf1 podría ser importante para el proceso de trimerización de la proteína VP7 (Martínez Guevara, 2015), el cual es esencial para el ensamblado de la capa externa de rotavirus (Chen et al., 2009; López et al., 2005). Para confirmar estos resultados, se evaluó los efectos de los tratamientos de BFA y GCA sobre la formación de los trímeros de VP7.

Para este ensayo, se infectaron células MA104 con RRV (MOI de 3) en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10 µM). A las 6 hpi las células fueron fijadas y co-inmunoteñidas con un anticuerpo contra la proteína NSP2 marcadora de viroplasmata, así como con el anticuerpo monoclonal 159 (mAb159), el cual solamente reconoce la forma trimérica de la proteína VP7 (Dormitzer et al., 2000; Shaw et al., 1986).

Mediante este ensayo se encontró que los tratamientos con BFA y GCA no afectan el tamaño ni el número de viroplasmata marcados con la proteína NSP2, los cuales fueron similares a los observados en las condiciones control (ausencia de inhibidores) (Figura 13).

Por otro lado, cuando se analizó la formación de los trímeros de VP7, se descubrió que en las condiciones control los trímeros de esta proteína se detectaron fácilmente con el anticuerpo mAb159 alrededor de los viroplasmata marcados con NSP2, formando una estructura similar a un anillo (Figura 13, fila superior). Sin embargo, cuando las células infectadas fueron tratadas con BFA o GCA, no fue posible detectar la presencia de los trímeros de VP7 aun cuando las células infectadas fueron positivas para la presencia de viroplasmata marcados con NSP2 (Figura 13, fila superior).

Para verificar que la inhibición en la formación de los trímeros de VP7 no fuese debido a la ausencia de esta proteína, se realizó este mismo experimento pero utilizando el anticuerpo monoclonal M60, el cual puede reconocer la forma monomérica de VP7 (Dormitzer et al., 2000; Shaw et al., 1986). De esta manera, se observó que en las condiciones control (ausencia de los inhibidores), la forma monomérica de VP7 presentó una distribución reticular en el citoplasma de las células (Figura 13, fila inferior), la cual rodeó a los viroplasmata de rotavirus sin mostrar alguna co-localización.

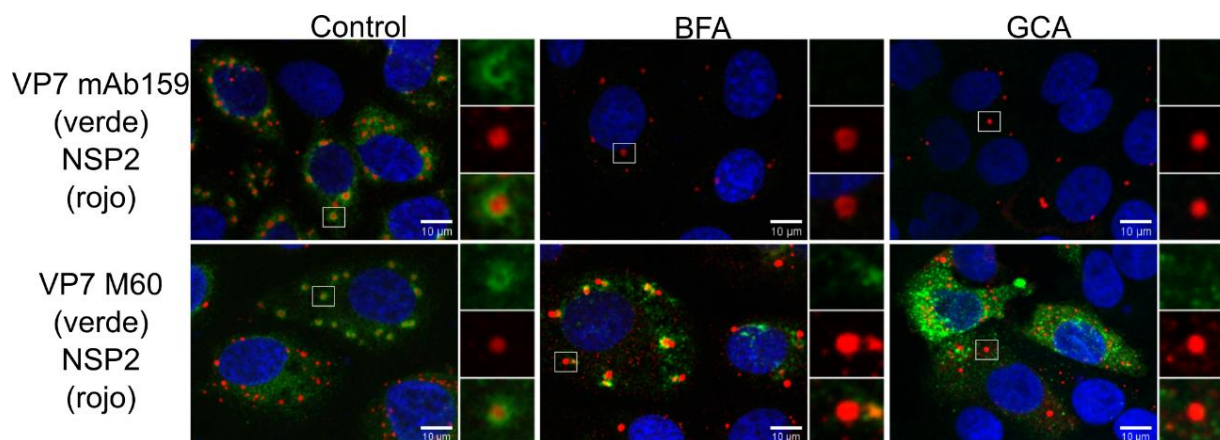


Figura 13. - BFA y GCA inhiben la trimerización de VP7. Inmunofluorescencia de células MA104 infectadas con RRV (MOI de 3) en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10 µM), en las cuales se detectaron ya sea la proteína NSP2 (rojo) y la forma trimérica de VP7 (mAb159, verde) (fila superior) o NSP2 (rojo) y la forma monomérica de VP7 (M60) (fila inferior). Los núcleos de las células (azul) se tiñeron con DAPI. El recuadro interno corresponde a las imágenes amplificadas mostradas a la derecha. La barra de escala corresponde a 10 µm.

Además de esto, a diferencia del anticuerpo mAb159, se observó que los tratamientos con BFA y GCA no inhibieron la señal del anticuerpo M60 correspondiente a los monómeros de VP7, los cuales modificaron su distribución hacia un arreglo granular dispersado por el citoplasma (Figura 13, fila inferior).

La alteración en la distribución de los monómeros de VP7 parece indicar que la falta de trimerización de esta proteína podría deberse un cambio en su localización en el RE. Para evaluar esta posibilidad, se analizó la colocalización de VP7 con la proteína fluorescente mTurquoise2 fusionada a una señal de retención del RE (mTurquoise2-RE), la cual se ha reportado que se localiza específicamente en el RE y puede ser usada como un marcador de este organelo (Cieri et al., 2018; Goedhart et al., 2012; Jiang et al., 2015).

Para este experimento se transfectaron células MA104 con el plásmido que codifica para la proteína mTurquoise2-RE, que es un marcador de RE. A las 24 hpt las células se infectaron con RRV (MOI de 5) en presencia o ausencia de BFA, y a las 6 hpi las células se fijaron e inmunotñieron con el anticuerpo M60 contra VP7. De esta forma se observó que la proteína mTurquoise2-RE presentó una distribución reticular característica del RE, la cual se mantuvo aun en presencia de BFA (Figura 14). Asimismo, cuando se comparó la distribución de la proteína mTurquoise2-RE con la de la proteína VP7, se encontró que tanto en ausencia como en presencia de BFA, ambas proteínas co-localizaron, indicando que la proteína VP7 se mantiene en el RE durante el tratamiento con BFA (Figura 14).

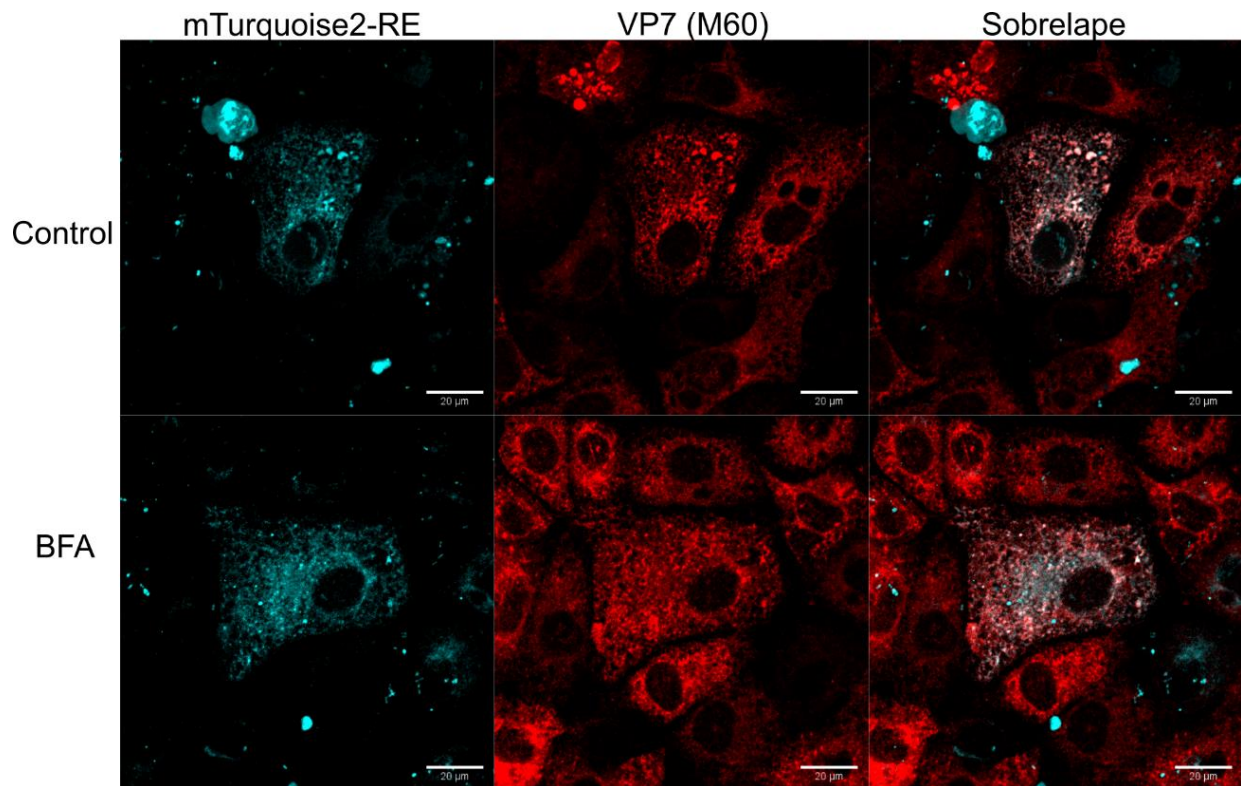


Figura 14.- VP7 se localiza en el RE en presencia de BFA. Inmunofluorescencia de células MA104 transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína mTurquoise2-RE (cian), las cuales fueron infectadas a las 24 hpt con RRV (MOI de 5) en ausencia o presencia de BFA (2.5 $\mu\text{g/ml}$). A las 6 hpi, las células fueron fijadas e inmunoteñidas con el anticuerpo M60 que reconoce la forma monomérica de VP7 (rojo). La barra de escala corresponde a 20 μm .

6.4. La presencia de NSP4 facilita (directa o indirectamente) la trimerización de VP7.

Para determinar el papel de NSP4 en los últimos pasos de la morfogénesis de rotavirus, se evaluó mediante inmunofluorescencia la trimerización de VP7 en células en las cuales la expresión de NSP4 se había disminuido por RNAi. Para esto se utilizó la línea celular MA104/NSP5-EGFP capaz de expresar establemente la proteína NSP5 (marcador de viroplasma) fusionada a la proteína fluorescente EGFP (del inglés “Enhanced Green Fluorescence Protein”), la cual es reclutada hacia los viroplasma de rotavirus, cuando estas células son infectadas (Eichwald et al., 2012, 2004). Estas células fueron utilizadas para observar, en una misma célula, la infección por rotavirus (juzgada por la presencia de viroplasma marcados con NSP5), el silenciamiento de NSP4 (disminución de la señal de NSP4) y la trimerización de VP7 (juzgada por su reconocimiento por el mAb 159).

Para este ensayo, las células MA104/NSP5-EGFP fueron transfectadas con un siRNA irrelevante (control negativo) o siRNAs contra la proteína NSP4. A las 72 hpt, las células fueron infectadas con RRV (MOI de 5) e incubadas por 6 h. Al término de este tiempo las células se fijaron y la presencia de NSP4, así como la de las distintas formas de VP7 (monómeros o trímeros), fueron detectadas utilizando anticuerpos específicos.

Como puede observarse en la figura 15a (fila superior), en las células transfectadas con el siRNA irrelevante se pudo detectar claramente la señal del anticuerpo mAb159 correspondiente a la forma trimérica de VP7. Sin embargo, en las células silenciadas para NSP4 no fue posible detectar la señal de los trímeros de VP7, esto a pesar de que las células fueron positivas para la presencia de viroplasmos marcados con NSP5-EGFP (Figura 15a, fila inferior, asteriscos). Por otro lado, durante este experimento también se observó que el silenciamiento de NSP4 indujo una reducción en el tamaño de los viroplasmos, lo cual concuerda con un reporte previo en donde se describió que el silenciamiento de NSP4 puede afectar la morfología de estos organelos virales (López et al., 2005).

Por otro lado, al igual que en los experimentos previos, se encontró que la falta de trimerización de VP7 no fue debida a una deficiencia en la síntesis de esta proteína, ya que la forma monomérica de VP7 (detectada con el anticuerpo M60) se observó tanto en las condiciones control (Irrelevante) (Figura 15b, fila superior) como en las células silenciadas para NSP4 (Figura 15b, fila inferior, asteriscos). Estos resultados sugieren que la proteína NSP4 podría jugar un papel importante en la trimerización de VP7. Sin embargo, considerando que el silenciamiento de NSP4 también impide la gemación de DLPs hacia el RE y afecta la morfología de los viroplasmos de rotavirus (López et al., 2005), la falta de trimerización de VP7 podría estar relacionada al bloqueo de alguno de los pasos previos al ensamble de la capa externa y no directamente a la función de NSP4.

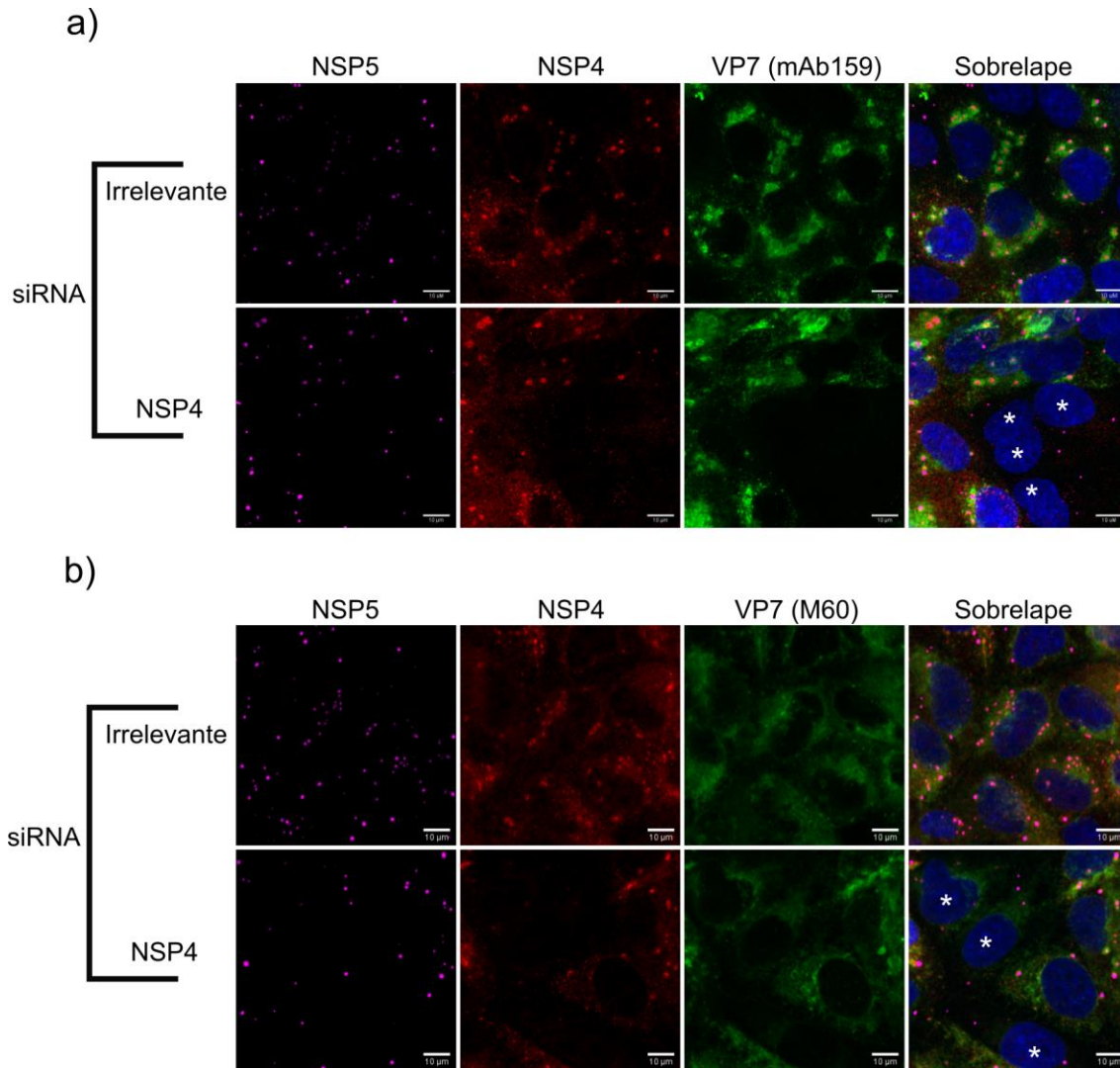


Figura 15.- El silenciamiento de NSP4 inhibe la trimerización de VP7. Inmunofluorescencia de células MA104/NSP5-EGFP transfectadas con los siRNAs indicados, en donde se detectó además de NSP5 (magenta), ya sea a) NSP4 (rojo) y los trímeros de VP7 (mAb159, verde) o b) NSP4 (rojo) y los monómeros de VP7 (M60, verde), mediante anticuerpos específicos. Los núcleos de las células (azul) fueron teñidos con DAPI. Los asteriscos blancos marcan las células silenciadas para NSP4. La barra de escala corresponde a 10μm.

Para probar esta posibilidad y confirmar si la presencia de NSP4 pudiera ser relevante para la formación de trímeros de VP7, se analizó el proceso de trimerización de esta proteína mediante la expresión heteróloga de VP7 tanto de manera individual como en conjunto con la proteína NSP4.

De esta forma, el plásmido de la proteína NSP4 (pcDNA3-NSP4) o el de la proteína no glicosilada VP7 (pcDNA3-VP7-noNg), cuya expresión está bajo el promotor T7, fueron transfectados individualmente o en conjunto en la línea celular Hek293/T7, la cual expresa constitutivamente la polimerasa T7 (pol T7) (Sandoval-Jaime et al., 2015).

Además de NSP4 y VP7, en cada condición evaluada también se transfectaron los plásmidos D1R y D12L que codifican para las dos subunidades de la guanililtransferasa del virus vaccinia (Kanai et al., 2017), la cual puede colocar el cap 5' en los transcritos de la pol T7 que son producidos en el citoplasma, de modo que estos puedan traducirse eficientemente. Una vez transfectadas con estos plásmidos las células se incubaron por 24 h, tiempo después del cual fueron fijadas e inmunoteñidas para detectar la presencia de NSP4, así como de las diferentes formas de VP7 (trímeros o monómeros).

Como puede observarse en la figura 16, mediante este experimento fue posible detectar claramente la presencia de la proteína NSP4, la cual se distribuyó como puntos discretos en el citoplasma, ya fuese que esta proteína se transfectara individualmente o en conjunto con VP7 (Figura 16, columna II). Asimismo, también se encontró que los monómeros de VP7 (detectados con el anticuerpo M60) mostraron una distribución granular en citoplasma independientemente de la presencia o ausencia de NSP4 (Figura 16, columna I).

Interesantemente, también se encontró que parte de los gránulos formados por los monómeros de VP7 pudieron colocalizar con NSP4 cuando estas proteínas se co-transfectaron (Figura 16, flechas blancas).

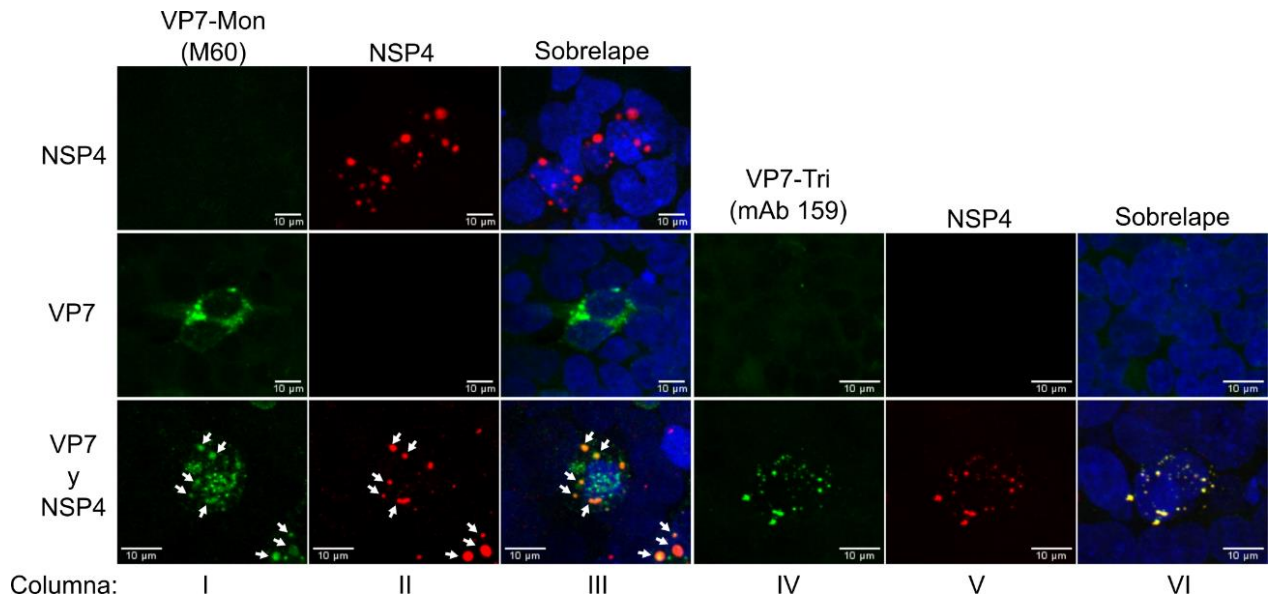


Figura 16.- La presencia de NSP4 facilita la trimerización de VP7. Inmunofluorescencia de células Hek293/T7 transfectadas con los plásmidos indicados, en las cuales se detectó ya sea la presencia de NSP4 (rojo) y los monómeros de VP7 (M60 [verde]) o NSP4 (rojo) y los trímeros de VP7 (mAb 159 [verde]) con anticuerpos específicos. Los núcleos de las células (azul) se tiñeron con DAPI. La barra de escala corresponde a 10µm.

Por otra parte, cuando se evaluó la presencia de los trímeros de VP7 en estas células se encontró que, a diferencia de los monómeros, la forma trimérica de esta proteína solamente puede ser detectada cuando VP7 fue transfectada junto con la proteína NSP4 (Figura 16, columna IV). Asimismo, también se observó que los trímeros de VP7 presentaron una distribución en puntos discretos, los cuales colocalizaron totalmente con la señal detectada para NSP4 (Figura 16, columnas IV, V y VI, paneles inferiores).

En conjunto, estos resultados confirman que la presencia de NSP4 es esencial (directa o indirectamente) para promover la trimerización de VP7. Para corroborar si los efectos encontrados con BFA y GCA sobre la trimerización y el ensamblado de VP7 pudieran estar relacionados a la ausencia de NSP4 en el RE, se evaluó la colocalización de esta proteína con el marcador mTurquoise2-RE en células tratadas con BFA.

Para este ensayo, se transfectaron células MA104 con el plásmido de la proteína mTurquoise2-RE. A las 24 hpt las células se infectaron con RRV (MOI de 5) en presencia o ausencia de BFA y se dejaron incubar por 6 h. Al término de este tiempo las células se fijaron e inmunotñieron con un anticuerpo específico contra NSP4.

Al igual que en los experimentos anteriores, se observó que la distribución de la proteína mTurquoise2-RE no fue modificada por la presencia de BFA (Figura 17). Por otro lado, también se observó que NSP4 presentó una distribución mayoritariamente homogénea en el citoplasma de la célula y además una distribución en forma de anillos ubicados hacia el centro de las células, los cuales presentaron una morfología muy similar a los viroplasmos de rotavirus, los cuales además tuvieron una buena colocalización con la proteína mTurquoise2-RE (Figura 17, paneles superiores).

Cuando las células fueron tratadas con BFA, se observó que la proteína NSP4 cambió su distribución, formando agregados en la periferia del núcleo celular. Sin embargo, a pesar de esta alteración, NSP4 continuó formando las estructuras de anillo en el centro de las células, los cuales se mantuvieron colocalizando con la proteína mTurquoise2-RE (Figura 17, paneles inferiores). Estos resultados indican que al igual que VP7, la proteína NSP4 se mantiene en el RE durante la inhibición del transporte mediado por COPI/Arf1.

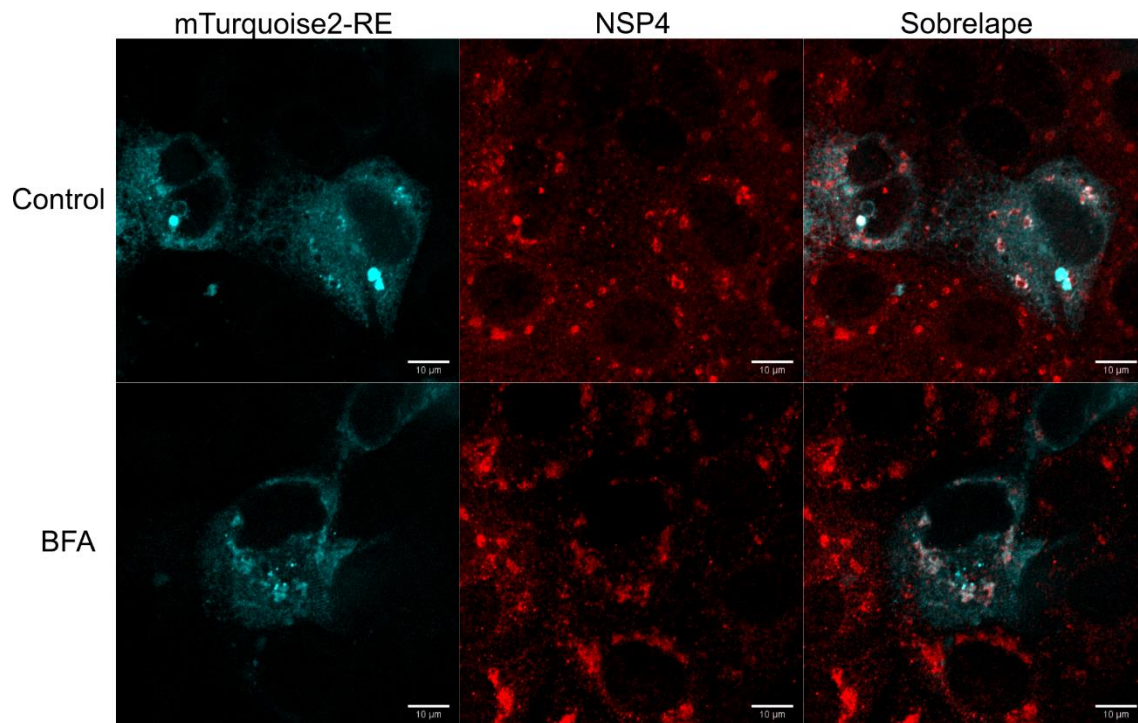


Figura 17.- NSP4 se localiza en el RE en ausencia y presencia de BFA. Células MA104 crecidas en cubre objetos fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína mTurquoise2-RE (cian), las cuales fueron infectadas a las 24 hpt con RRV (MOI de 5) en ausencia o presencia de BFA (2.5 µg/ml). A las 6 hpi, las células fueron fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo específico contra NSP4 (rojo).

6.5. El intercambiador de nucleótidos de guanina GBF1 es esencial para la morfogénesis de rotavirus.

Tanto BFA como GCA son capaces de bloquear el transporte mediado por COPI/Arf1, sin embargo, se ha reportado que estos inhibidores difieren en su especificidad para inhibir el transporte intracelular. Por un lado, GCA es un inhibidor específico del factor GBF1 que bloquea específicamente el transporte mediado por COPI/Arf1 sin afectar otros tipos de transporte, mientras que BFA es un inhibidor inespecífico que puede bloquear la actividad del factor GBF1 localizado en la membrana del cis-Golgi así como la actividad de los intercambiadores BIG1 y BIG2 ubicados en la membrana del trans-Golgi, induciendo con esto una inhibición del transporte mediado por COPI/Arf1 y del transporte mediado por clatrina (Popoff et al., 2011; Sáenz et al., 2009).

Tomando en cuenta que la inhibición específica de GBF1 a través de GCA induce los mismos efectos que BFA en la morfogénesis de rotavirus, se decidió evaluar la importancia del transporte retrógrado en la replicación de rotavirus mediante el silenciamiento de la expresión de

GBF1, el cual promueve específicamente el transporte mediado por COPI/Arf1. Asimismo, dado que el bloqueo de la actividad de GBF1 inducido por BFA y GCA tiene como efecto final la inhibición en la activación de Arf1, también se evaluó el efecto del silenciamiento de esta proteína sobre la replicación de rotavirus.

De esta manera, células MA104 fueron transfectadas con un siRNA irrelevante o siRNAs ya sea contra la proteína GBF1 o Arf1. A las 72 hpt, las células transfectadas se lisaron para evaluar la expresión de las proteínas por western blot o se infectaron con RRV (MOI de 5) y se dejaron incubar por 12 h. Al término de este tiempo, las células infectadas junto con el medio extracelular fueron sometidas a 2 ciclos de congelación-descongelación para liberar el virus total producido. Finalmente, el virus infeccioso contenido estos lisados fue titulado por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa.

Como puede observarse en las figuras 18a y 18b, la transfección de los diferentes siRNAs logró disminuir eficientemente la expresión de las proteínas GBF1 y Arf1. Al analizar la progenie viral producida en estas condiciones, se encontró que mientras el silenciamiento de GBF1 logró disminuir significativamente (~70%) la progenie viral de rotavirus, el silenciamiento de Arf1 no tuvo efecto sobre la producción del virus (Figura 18c).

Asimismo, se observó que este efecto no fue debido a una reducción en la viabilidad de las células transfectadas con los siRNAs, ya que cuando se evaluó la liberación de la enzima LDH al medio extracelular, un indicador de la integridad de la membrana celular, se encontró que el silenciamiento de GBF1 y Arf1 no afectó el porcentaje de LDH liberado al medio, el cual fue muy similar al obtenido en las células transfectadas con el siRNA irrelevante (Figura 18d).

Para evaluar si los efectos del silenciamiento de GBF1 en la progenie viral pudieran estar relacionados con los pasos iniciales del ciclo de replicación del virus se determinó la infectividad (número de células infectadas) de RRV en células donde se silenció este factor. Dado que el ensayo para cuantificar la infectividad del virus está basado en la detección de la síntesis de proteínas virales con anticuerpos (ver Metodología), a través de este ensayo es posible detectar defectos en la entrada del virus, en la transcripción de su genoma y en la traducción de los mRNAs virales (síntesis de proteínas). De esta forma al igual que en los ensayos de progenie viral, células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados. A las 72 hpt las células se

infectaron con RRV a un MOI de 0.025 por 12 h. Finalmente, las células se fijaron y la infectividad se determinó mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Mediante este ensayo se encontró que los silenciamientos de Arf1 y GBF1 no afectaron la infectividad de RRV (Figura 18e), indicando que los primeros pasos del ciclo de replicación que van desde la entrada del virus hasta la síntesis de proteínas, no se afectan por el silenciamiento de GBF1.

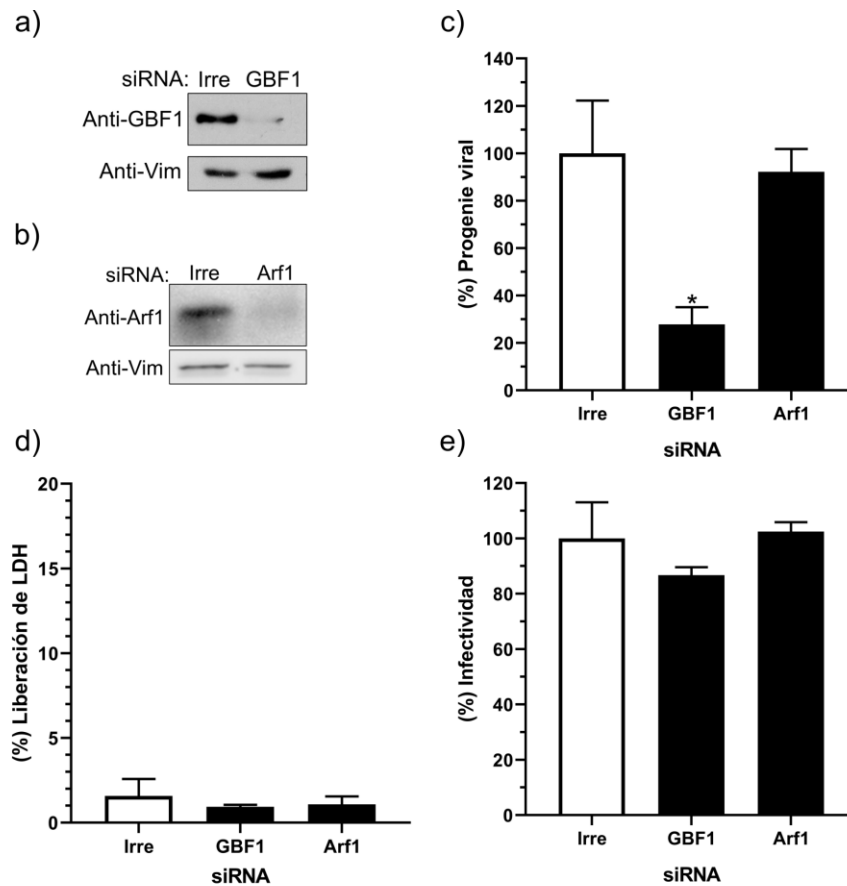


Figura 18.- El silenciamiento de GBF1 inhibe la progenie viral de rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados. A las 72 hpt, las células fueron lisadas y la expresión de GBF1 (a) y Arf1 (b) fue analizada mediante western blot utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas. La proteína vimentina (Vim) detectada con un anticuerpo específico fue utilizada como control de carga. c) Progenie viral producida en células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados. Los datos representan los porcentajes de progenie viral, tomando como el 100% la progenie viral producida en la condición control (Irre). d) porcentajes de liberación de LDH en las células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados. El porcentaje de LDH liberado se expresó en relación con los niveles de LDH total (LDH intracelular más el LDH liberado). e) Infectividad de rotavirus en células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados. Los datos representan los porcentajes de infectividad, tomando como el 100% la infectividad de la condición control (Irre). Las barras en c, d y e representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos realizados por duplicado. *, $P < 0.05$.

Por otra parte, para analizar si la reducción en la progenie viral inducida por el silenciamiento de GBF1 pudiera estar relacionada con una alteración en la movilidad electroforética de VP7 y NSP4, se evaluó el efecto de este silenciamiento sobre la síntesis de proteínas virales y celulares mediante un ensayo de pulso y caza utilizando [³⁵S]Met/Cis (ver Metodología). Para este experimento se utilizaron BFA y GCA como control positivo.

Como se reportó anteriormente, se encontró que los tratamientos con BFA y GCA, no afectaron la síntesis de las proteínas celulares ni virales. Sin embargo, estos inhibidores indujeron un cambio en la movilidad electroforética de VP7 y NSP4 (Figura 19a) (Martínez Guevara, 2015; Mirazimi et al., 1996).

De manera interesante, se descubrió que al igual que BFA y GCA, el silenciamiento de GBF1 tampoco afectó la síntesis de proteínas celulares ni virales, pero indujo una alteración en la migración electroforética de VP7 (menor migración) y NSP4 (mayor migración) (Figura 19b). Sin embargo, a diferencia de los tratamientos con BFA y GCA, se encontró que las modificaciones en VP7 y NSP4 inducidas por el silenciamiento de GBF1 fueron parciales, lo cual muy probablemente puede deberse a la presencia residual de proteína GBF1 no silenciada.

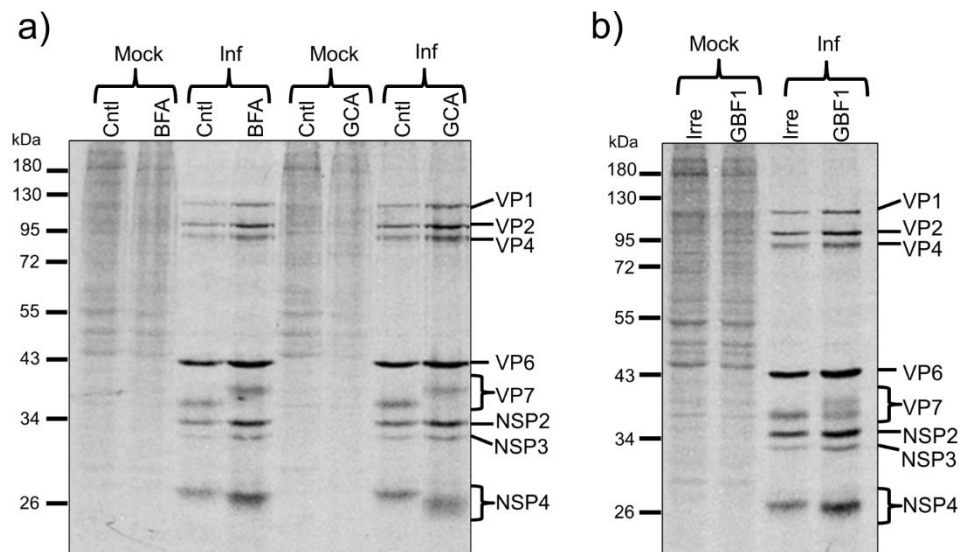


Figura 19.- La inhibición de GBF1 altera la movilidad electroforética de VP7 y NSP4. a) Autoradiografía de lisados de células no infectadas (Mock) o infectadas (Inf) (RRV, MOI de 5) que fueron tratadas con BFA (2.5 µg/ml) o GCA (10µM) o dejadas sin ningún tratamiento (Cntl). Las proteínas celulares y virales fueron marcadas a las 7.5 hpi mediante un pulso de 30 min con 25 µCi/ml de [³⁵S]Met/Cis y posteriormente cazadas a las 10 hpi. b) Autoradiografía de lisados de células no infectadas (Mock) o infectadas (Inf) (RRV, MOI de 5) que fueron transfectadas con los siRNAs indicados, las cuales fueron sometidas a un ensayo de pulso y caza como se describió en b. El patrón de migración de las proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus se indican a la derecha.

Finalmente, también se analizó por inmunofluorescencia, si el silenciamiento de GBF1 pudiera estar bloqueando la producción de virus infeccioso al inhibir la trimerización de VP7. Para esto, células MA104 fueron transfectadas con un siRNA irrelevante o siRNAs contra GBF1. A las 72 hpt, las células fueron infectadas con RRV (MOI de 5) e incubadas por 6 h. Al término de este tiempo las células se fijaron y la presencia de NSP4, así como la de las distintas formas de VP7 (monómeros o trímeros), fueron detectadas utilizando anticuerpos específicos.

Como puede observarse en la figura 20 (fila superior), en las células transfectadas con el siRNA irrelevante se pudo detectar claramente la señal del anticuerpo mAb159 correspondiente a la forma trimérica de VP7. Sin embargo, en las células silenciadas para GBF1 no fue posible detectar la señal de los trímeros de VP7, esto a pesar de que las células fueron positivas para la presencia de viroplasmos marcados con NSP2. Del mismo modo, al igual que en los experimentos previos, se encontró que la falta de trimerización de VP7 no fue debida a una deficiencia en la síntesis de esta proteína, ya que la forma monomérica de VP7 (detectada con el anticuerpo M60) pudo ser observada tanto en las condiciones control (Irrelevante) como en las células silenciadas para GBF1 (Figura 20, fila inferior).

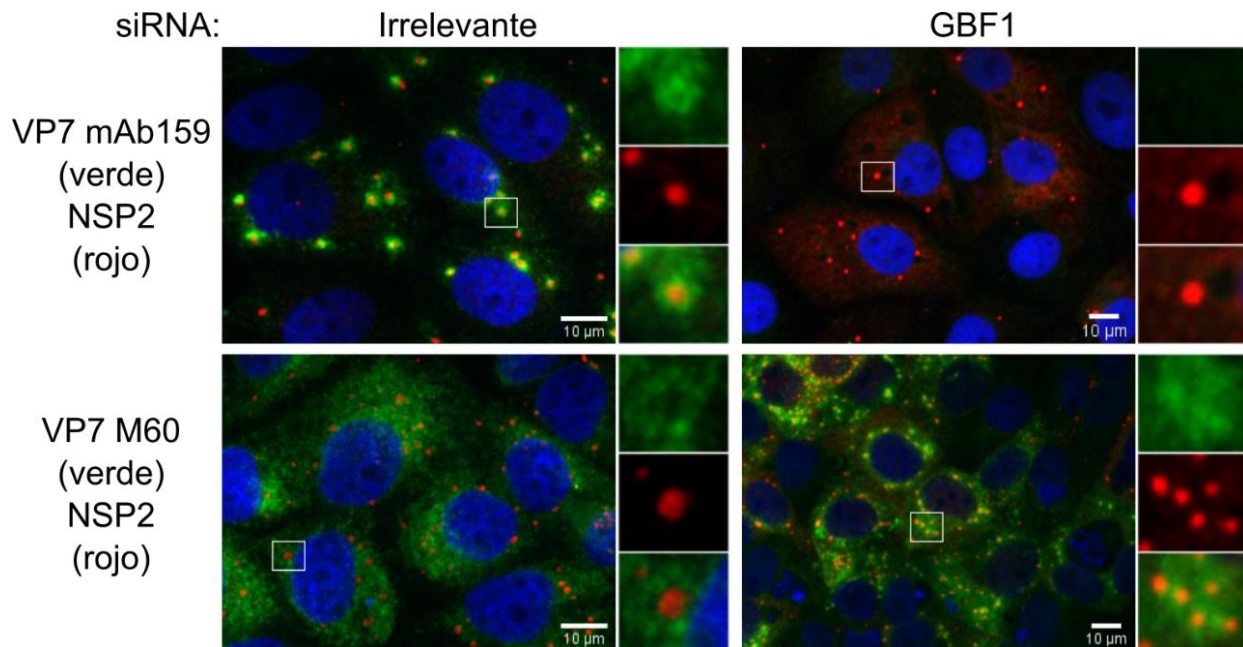


Figura 20.- El silenciamiento de GBF1 inhibe la trimerización de VP7. Inmunofluorescencia de células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados, en donde se detectó ya sea a) NSP2 (rojo) y los trímeros de VP7 (mAb159, verde) o b) NSP2 (rojo) y los monómeros de VP7 (M60, verde), mediante anticuerpos específicos. Los núcleos de las células (azul) fueron teñidos con DAPI. La barra de escala corresponde a 10µm.

En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína GBF1 es esencial para la morfogénesis de rotavirus y que los efectos de BFA y GCA sobre la morfogénesis del virus están relacionados con este intercambiador de nucleótidos.

Con el objetivo de comprobar esta posibilidad, se analizó si la sobre-expresión de GBF1 podría revertir los efectos de BFA (inhibidor inespecífico) sobre la producción de virus infeccioso. Para este ensayo, células Hek293 fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína mutante GBF1/795, que posee un cambio en la alanina 795 por un ácido glutámico (A795E), el cual le confiere resistencia a la inhibición por BFA, sin alterar la actividad de GBF1 como intercambiador de nucleótidos (Belov et al., 2008). Además de esto, para facilitar su detección esta proteína estuvo fusionada a través de extremo N-terminal a la proteína fluorescente mVenus (Figura 21, mVenus-GBF1/795).

A las 24 hpt con el plásmido que expresa a la proteína GBF/795, las células fueron infectadas con RRV (MOI de 5) en presencia o ausencia de BFA por 12 h. Después de ese tiempo se determinó el título del virus infeccioso en los lisados obtenidos mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Al igual que en experimentos anteriores se encontró que la adición de BFA en células no transfectadas (Figura 22a, Mock) disminuyó la progenie viral de rotavirus de forma significativa (~90%). Sin embargo, cuando las células fueron transfectadas con la mutante mVenus-GBF1/795 se observó una recuperación significativa de la progenie viral de rotavirus en presencia de BFA, la cual aumentó hasta alrededor de un 70% (Figura 22a, mVenus-GBF1/795 + BFA). Tomando en cuenta que la eficiencia de transfección que se puede lograr con las células Hek293 ronda alrededor del 70-80%, estos resultados indican que la sobreexpresión de GBF1 es suficiente para revertir los efectos de BFA sobre la replicación de rotavirus.

Estudios previos han encontrado que GBF1 puede participar en diferentes procesos celulares (Anders y Jürgens, 2008), así como en la infección de virus e RNA (ver tabla 1) y algunas bacterias (Misselwitz et al., 2014; Pokrovskaya et al., 2012). Si bien para muchas de estas funciones no conoce a detalle el papel de GBF1, en varios casos se encontrado que dominios específicos de la estructura de GBF1 son importantes para que este factor pueda interactuar con distintas proteínas, a través de las cuales ejerce su función.

Debido a esto, se evaluó la relevancia de los distintos dominios de GBF1 para la producción de progenie viral a través de diferentes variantes truncadas, en donde se realizó la delección progresiva del extremo C-terminal de la mutante mVenus-GBF1/795, hasta obtener una proteína que contuviera solamente los dominios DCB y HUS del extremo N-terminal de GBF1 (Figura 21). La capacidad de las distintas mutantes de GBF1 para mantener la replicación de rotavirus se realizó como se describió anteriormente para la proteína completa mVenus-GBF1/795.

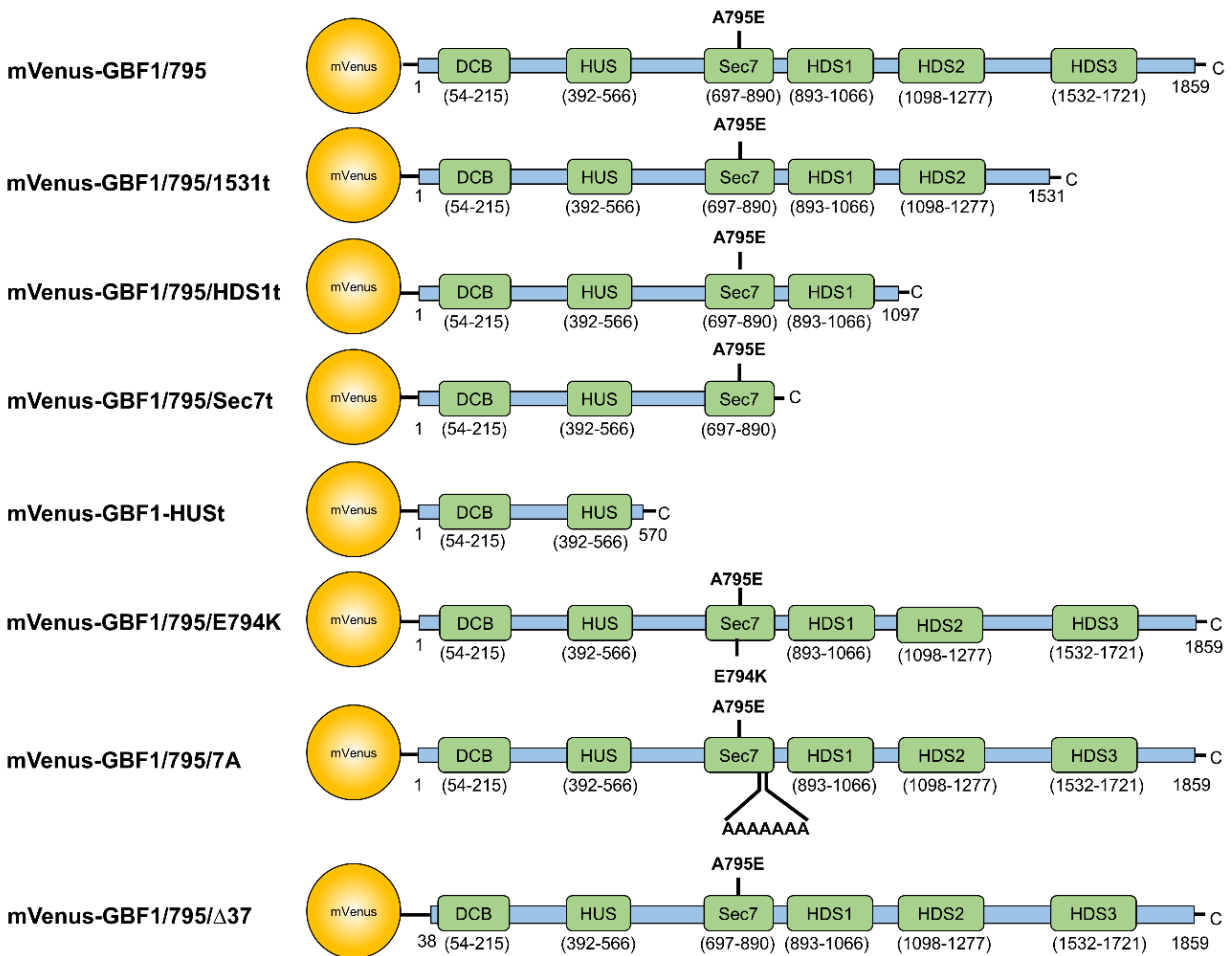


Figura 21.- Diagrama de la estructura primaria de la proteína mutante mVenus-GBF1/795 y de las diferentes variantes de esta proteína utilizadas en este estudio. Se incluyen la posición de los 7 dominios de GBF1, así como las mutaciones realizadas en cada proteína. Los aminoácidos de GBF1 se indican por los números en paréntesis.

Como puede observarse en la figura 22a, de las delecciones probadas, se encontró que solamente la transfección de la variante truncada mVenus-GBF1/795/1531t fue capaz de promover una recuperación en la progenie viral de rotavirus producida en presencia de BFA. Sin

embargo, a diferencia de la recuperación observada con la proteína completa mVenus-GBF1/795 (~70%), esta proteína recuperó aproximadamente un 50% de la progenie viral (Figura 22a).

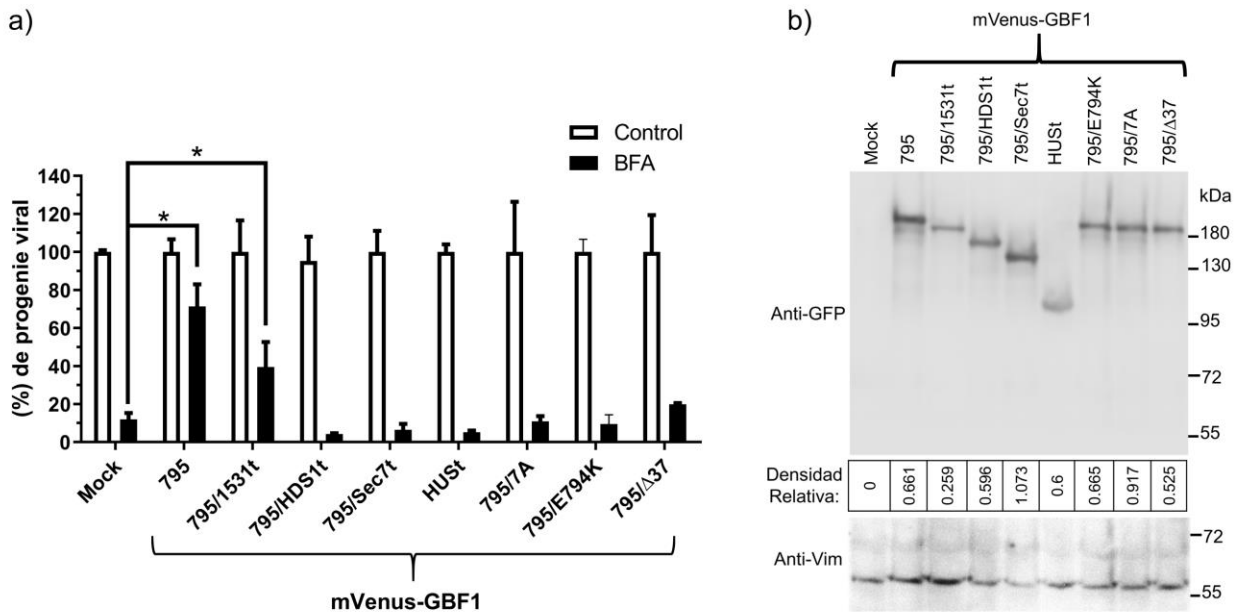


Figura 22.- La sobre-expresión de la proteína GBF1 revierte los efectos de BFA sobre la producción de virus infeccioso. a) Progenie viral de rotavirus producida en células Hek293 que fueron transfectadas con los plásmidos de la mutantes de GBF1 indicadas e infectadas con RRV (MOI 5) en ausencia o presencia de 2.5 μ g/ml BFA. Los datos representan los porcentajes de progenie viral, tomando como el 100% la progenie viral producida en la condición control (ausencia de BFA). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en cinco experimentos realizados por duplicado. *, $P < 0.05$. b) Western blot representativo de la expresión de las mutantes de GBF1 indicadas (24 hpt). Las diferentes mutantes fueron detectadas utilizando un anticuerpo contra GFP, que es capaz de reconocer a la proteína mVenus. La proteína vimentina (Vim) detectada con un anticuerpo específico fue utilizada como control de carga. Las bandas de cada proteína mutante de GBF1 y su respectiva vimentina fueron cuantificadas por densitometría. La densidad relativa de la expresión de cada proteína GBF1 con respecto a vimentina se indica en la parte intermedia

Cuando se evaluaron los niveles de expresión de las dos mutantes de GBF1 que recuperaron la replicación del virus, se encontró que la proteína mVenus-GBF1/795 tuvo una mayor expresión en comparación con la proteína mVenus-GBF1/795/1531t (Figura 22b, comparar densidades relativas de expresión), por lo que las diferencias en la recuperación de progenie observadas pudieran ser debidas a una menor expresión de mVenus-GBF1/795/1531t. Del mismo modo, se observó que el resto de las deleciones de la proteína mVenus-GBF1/795 tuvieron una expresión similar o mayor a la proteína completa (Figura 22b, comparar densidades relativas de expresión). Por lo anterior, la falta de recuperación en la progenie viral para estas proteínas (Figura 22a) no fue debido a un defecto en su síntesis o estabilidad.

Por otra parte, dado que los efectos del silenciamiento de Arf1 en células MA104 parecían indicar que la actividad de intercambiador de nucleótidos de GBF1 es dispensable para rotavirus, se decidió evaluar si mutantes de GBF1/795 carentes de esta actividad son capaces de mantener la replicación de rotavirus.

Para estos ensayos, se utilizó la variante denominada mVenus-GBF1/795/E794K, en la cual el residuo de ácido glutámico (794) que induce el intercambio de nucleótidos en Sec7 fue sustituido por un residuo de lisina (Figura 21, mVenus-GBF1/795/E794K) (García-Mata et al., 2003). Asimismo, también se empleó una mutante de GBF1/795 incapaz de unirse a las proteínas Arfs, esto debido a la sustitución de 7 aminoácidos ubicados al final del dominio Sec7 (EIVMPEE en las posiciones 883–889) por 7 alaninas (Figura 21, mVenus-GBF1/795/7A) (Lowery et al., 2011).

Con estas mutantes, se descubrió que a diferencia de la versión mVenus-GBF1/795, las mutantes mVenus-GBF1/795/E794K y mVenus-GBF1/795/7A no lograron rescatar la replicación de rotavirus en presencia de BFA (Figura 22a), esto a pesar de que su expresión fue similar o mayor a la de la proteína mVenus-GBF1/795 activa (Figura 22b, comparar densidades relativas). Este resultado indica que la actividad de intercambiador de nucleótidos de GBF1 es importante para rotavirus.

Finalmente, para analizar la importancia del extremo N-terminal de GBF1, se evaluó si una variante truncada en la cual se deletaron los primeros 37 aminoácidos del extremo N-terminal de GBF1 (Figura 21, mVenus-GBF1/795/ Δ 37), era capaz de sostener la replicación de rotavirus. Esta delección se evaluó ya que se ha reportado que los primeros 37 aa son importantes para que GBF1 participe en la replicación de coxsackievirus 3B (CVB3) y poliovirus (Belov et al., 2008; Wessels et al., 2006b).

Al evaluar esta proteína se encontró que la delección de 37 aminoácidos fue suficiente para abolir la capacidad de la proteína mVenus-GBF1/795 de sostener la replicación de rotavirus en presencia de BFA (Figura 22a), esto a pesar de que la proteína truncada mVenus-GBF1/795/ Δ 37 tuvo una expresión cercana a la proteína mVenus-GBF1/795 (Figura 22b, comparar densidades relativas).

En la replicación de poliovirus y CVB3, se ha reportado que estos 37 aminoácidos son importantes para el reclutamiento de GBF1 hacia los centros de replicación de estos virus (Belov et al., 2008). Para poder examinar si al igual que en estos virus, el extremo N-terminal de GBF1 pudiese ser importante para re-direccionar esta proteína hacia los viroplasmata de rotavirus, se evaluó mediante un ensayo de inmunofluorescencia la colocalización de GBF1 con la proteína NSP2 marcadora de viroplasmata. Para esto, células MA104 no infectadas o infectadas con RRV (MOI de 1) fueron fijadas a las 6 hpi y la presencia de GBF1 y NSP2 fue detectada con anticuerpos específicos.

Mediante este ensayo se detectó que, en células no infectadas, GBF1 se distribuyó como un grupo compacto cercano al núcleo, similar a la señal detectada para el aparato de Golgi (Figura 23, paneles superiores). Al infectar las células se observó que GBF1 cambió a un patrón menos compacto (Figura 23, paneles inferiores). No obstante, a pesar de este cambio GBF1 no colocalizó con los viroplasmata marcados con NSP2. Este resultado indica que el papel de GBF1 en la replicación de rotavirus no parece estar relacionado directamente con los viroplasmata de rotavirus.

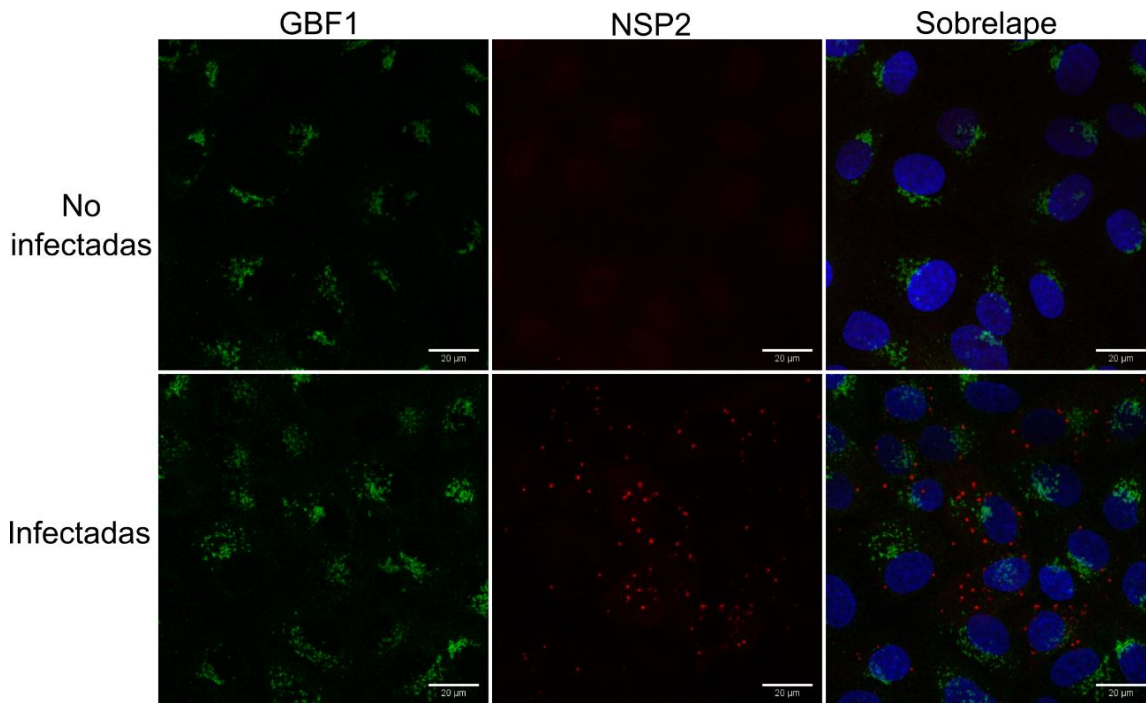


Figura 23.- GBF1 no colocaliza con los viroplasmata de rotavirus. Células MA104 crecidas en cubreobjetos fueron infectadas o no con RRV (MOI de 1). A las 6 hpi las células fueron fijadas e incubadas con anticuerpos específicos para detectar a la proteína NSP2 (rojo), utilizada como un marcador de viroplasmata, y a la proteína GBF1 (verde). Los núcleos de las células (azul) se tiñeron con DAPI. La barra de escala corresponde a 20 µm.

6.6. La inhibición del metabolismo de lípidos reduce la replicación de rotavirus

Dada la estrecha relación del transporte vesicular mediado por GBF1 con el metabolismo de lípidos (Kaczmarek et al., 2017), se evaluó si los efectos de la inhibición del transporte pudieran estar relacionados con una alteración en la formación de las LDs, que son importantes para la biogénesis de viroplasmos, se analizó mediante inmunofluorescencia la colocalización de la proteína NSP2 con el colorante Bodipy 493/503, el cual tiñe de manera específica los lípidos neutros que componen las LDs.

Para este ensayo, células MA104 crecidas en cubreobjetos de vidrio fueron incubadas con Bodipy 493/503 por 1 h. Al término de este tiempo el colorante fue retirado y las células fueron infectadas con RRV en presencia o ausencia de BFA. Finalmente, las células fueron fijadas a las 6 hpi y los viroplasmos fueron detectados utilizando un anticuerpo específico contra NSP2. De esta forma, se encontró que las LDs marcadas con Bodipy 493/503 tuvieron una alta colocalización con los viroplasmos de rotavirus (Figura 24, paneles superiores). Asimismo, cuando las células fueron tratadas con BFA se observó que al igual que en experimentos anteriores, este inhibidor no afectó el tamaño o número de viroplasmos formados por rotavirus. Interesantemente, se observó que la adición de BFA tampoco alteró la colocalización de NSP2 con Bodipy 493/503 (Figura 24, paneles inferiores).

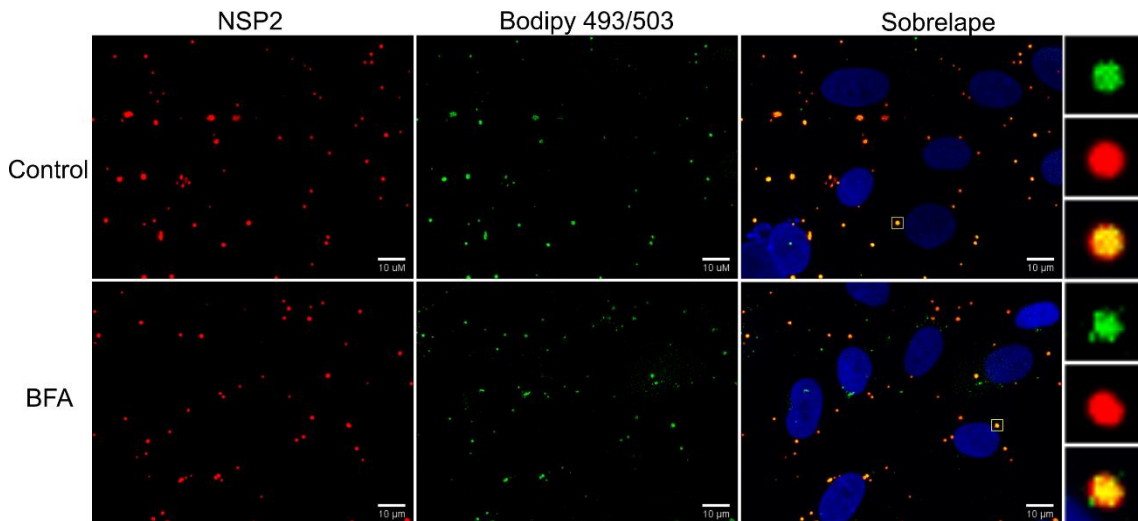


Figura 24.- El tratamiento con BFA no afecta la colocalización de los viroplasmos con las LDs. Inmunofluorescencia de células MA104 infectadas con RRV (MOI de 1) en presencia o ausencia de BFA (2.5 μg/ml). La detección de viroplasmos y LDs se realizó mediante un anticuerpo específico contra NSP2 y el colorante Bodipy 493/503, respectivamente. Los núcleos de las células (azul) se tiñeron con DAPI. El recuadro interno corresponde a las imágenes amplificadas mostradas a la derecha. La barra de escala corresponde a 10 μm.

Por otra parte, para evaluar la importancia de la estabilidad y funciones de las LDs en la morfogénesis de rotavirus, se optó por evaluar si el silenciamiento de diferentes enzimas involucradas con el metabolismo de lípidos y la formación y función de LDs, pudiera afectar la replicación de rotavirus.

En primer lugar, se decidió evaluar la importancia de la enzima ácido graso sintasa (“FAS” por sus siglas en inglés), encargada de la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. Asimismo, se evaluó la relevancia de la enzima diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (“DGAT1” por sus siglas en inglés) que cataliza el último paso de síntesis de triacilgliceroles a partir de ácidos grasos libres y diacilgliceroles.

Por otro lado, para analizar si la movilización de ácidos grasos a partir de las LDs pudiera ser importante para rotavirus, también se silenció la enzima adipocito triglicérido lipasa (“ATGL” por sus siglas en inglés), que cataliza la liberación de ácidos grasos a partir de triacilgliceroles, la cual además es transportada hacia la superficie de las LDs a través de su interacción con GBF1 (Ellong et al., 2011).

De esta forma, células MA104 fueron transfectadas con un siRNA irrelevante o siRNAs contra las proteínas FAS, DGAT1 o ATGL. A las 72 hpt, las células transfectadas se lisaron para evaluar la expresión de las proteínas por western blot o se infectaron con RRV y se dejaron incubar por 12 h más. Al término de este tiempo las células infectadas junto con el medio extracelular fueron sometidas a 2 ciclos de congelación-descongelación para liberar el virus total producido. Finalmente, el virus infeccioso presente en estos lisados fue titulado por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa.

La transfección con los diferentes siRNAs logró disminuir claramente la expresión de las enzimas FAS (Figura 25a), DGAT1 (Figura 25b) y ATGL (Figura 25c). Al analizar la progenie viral producida en estas condiciones se descubrió que la disminución en la expresión de estas enzimas redujo significativamente (entre un 40 y un 50%) la progenie viral (Figura 25d).

Para comprobar si la reducción de progenie viral observada en ausencia de estas proteínas pudiese estar relacionada a un defecto en los pasos iniciales de la replicación de rotavirus, también se determinó la infectividad del virus durante la transfección de los distintos

siRNAs por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa. Se encontró que el silenciamiento de estas enzimas disminuyó alrededor de un 20% la infectividad de rotavirus (Figura 25e), indicando que la ausencia de FAS, DGAT1 o ATGL afecta ligeramente los pasos iniciales del ciclo de replicación del virus.

Asimismo, cuando se evaluó la viabilidad de las células durante estos silenciamientos mediante un ensayo de liberación de LDH, se observó que el silenciamiento de FAS, DGAT1 o ATGL no afectó la viabilidad celular (Figura 25f).

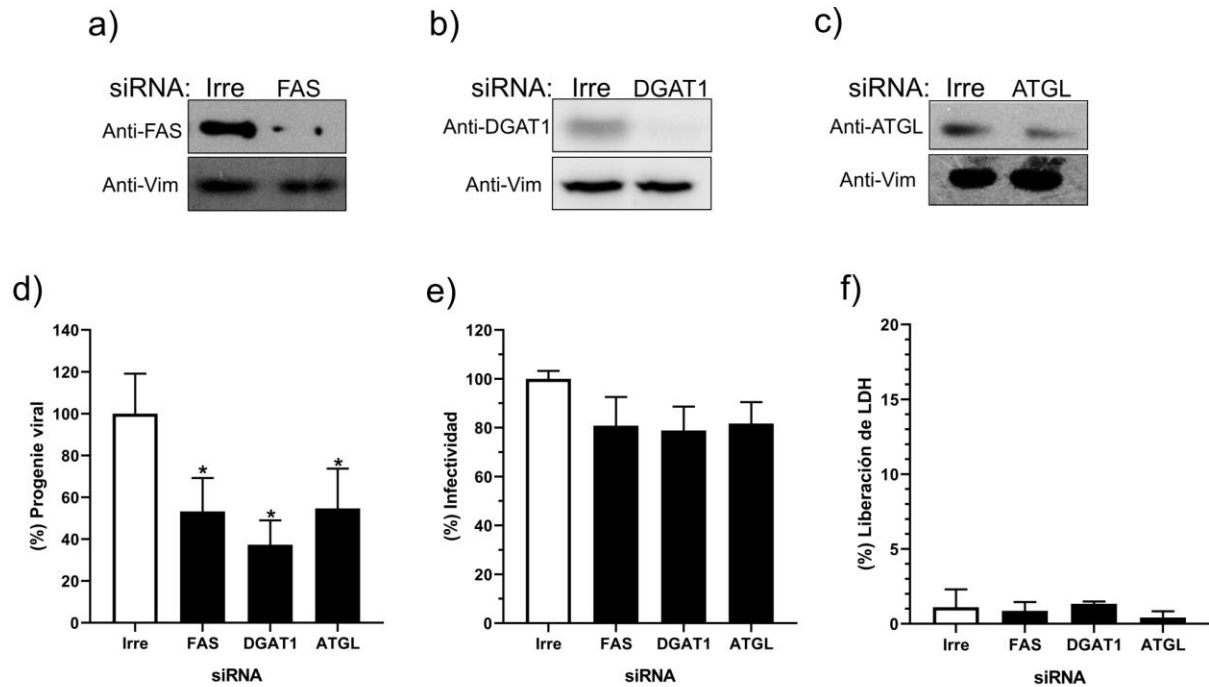


Figura 25.- El silenciamiento de metabolismo de lípidos inhibe la replicación viral de rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados. A las 72 hpt, las células fueron lisadas y la expresión de FAS (a), DGAT1 (b) y ATGL (c) fue analizada mediante western blot utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas. La proteína vimentina (Vim) detectada con un anticuerpo específico fue utilizada como control de carga. d) Progenie viral producida en células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados. Los datos representan los porcentajes de progenie viral, tomando como el 100% la progenie viral producida en la condición control (Irre). e) Infectividad de rotavirus en células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados. Los datos representan los porcentajes de infectividad, tomando como el 100% la infectividad de la condición control (Irre). f) Porcentajes de liberación de LDH en las células MA104 transfectadas con los siRNAs indicados. El porcentaje de LDH liberada se expresó en relación con los niveles de LDH total (LDH intracelular más el LDH liberada). Las barras en d, e y f representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos realizados por duplicado. *, $P < 0.05$.

Como una segunda alternativa para analizar la importancia de las LDs en la replicación del virus también se caracterizaron los efectos de inhibidores farmacológicos de la estabilidad o función de LDs sobre la producción de virus infeccioso.

Para evaluar la importancia de la lipogénesis en la replicación de rotavirus, se utilizó el fármaco C75 que inhibe de forma alostérica a la enzima FAS (Schmid et al., 2005), así como el compuesto TOFA, el cual es un inhibidor de la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) (Parker et al., 1977)], enzima encargada de la síntesis del malonil-CoA que es utilizado para generación de los ácidos grasos. Asimismo, también se evaluó el efecto de inhibir la lipólisis mediante el compuesto DEUP, el cual es un inhibidor general de lipasas (Harrison et al., 1990), así como la importancia de la β -oxidación mediante el compuesto etomoxir, el cual es un inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I) (Rambold et al., 2015), encargada de transportar ácidos grasos hacia la mitocondria para la β -oxidación.

Células MA104 tratadas por 30 min con diferentes concentraciones de estos inhibidores fueron infectadas con RRV (MOI de 5) en presencia de los respectivos inhibidores por 1 h, al final de este tiempo se retiró el virus no internalizado y se añadió medio nuevo con el mismo inhibidor. A las 12 hpi se determinó el título de virus infeccioso por un ensayo de inmunoperoxidasa.

Como resultado de estos experimentos observamos que la adición de C75 a una concentración de 15 μ M redujo aproximadamente el 90% de la progenie viral (Figura 26a). Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor TOFA, se encontró que mientras las concentraciones de 0.6 y 1.2 μ M redujeron solamente un 20% de la progenie viral, una concentración de 2.4 μ M fue capaz de reducir en un 50% el virus infeccioso (Figura 26b). Asimismo, se observó que mientras la presencia de DEUP en concentraciones de 12.5, 25 y 50 μ M tuvo un ligero efecto sobre la replicación de rotavirus (reducción de entre 15 y 20%), la adición de este compuesto a una concentración de 100 μ M logró reducir significativamente (~80%) la progenie de rotavirus (Figura 26c). Finalmente, en este ensayo también se encontró que la adición de etomoxir no afectó la producción de virus infeccioso en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 26d).

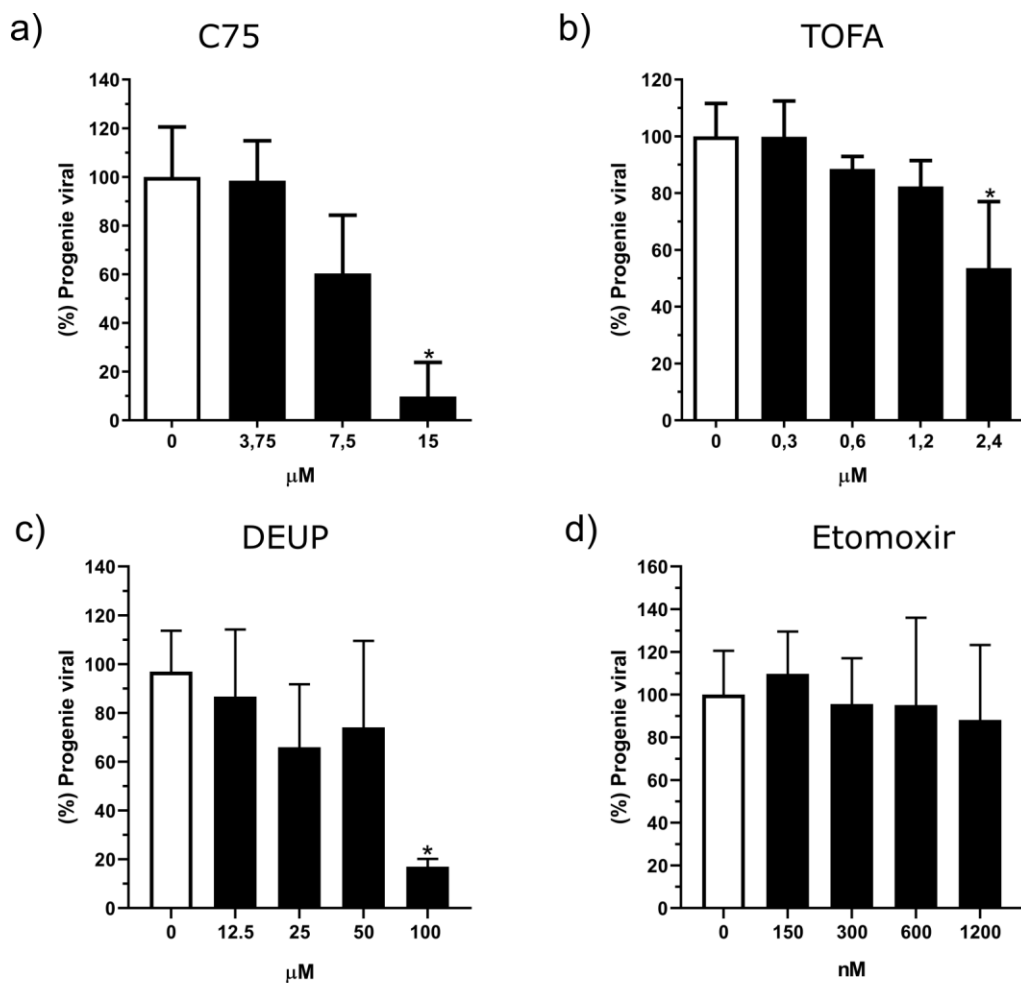


Figura 26.- Los tratamientos con C75, TOFA y DEUP reducen la producción de progenie viral de rotavirus. Progenie viral producida a las 12hpi en células MA104 tratadas con diferentes concentraciones de C75 (a), TOFA (b), DEUP (c) o etomoxir (d). Los datos representan los porcentajes de progenie viral, tomando como el 100% la progenie viral producida en la condición control (ausencia de inhibidor). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos realizados por duplicado. *, $P < 0.05$.

Para corroborar que los efectos de C75, TOFA y DEUP sobre la replicación de rotavirus no fuesen debido a una alteración en la viabilidad celular, se realizó un ensayo de liberación de LDH en las células tratadas con los diferentes inhibidores. Dado que la adición de etomoxir no redujo la progenie de rotavirus, este inhibidor no fue tomado en cuenta para este experimento y los realizados posteriormente.

Por medio de este ensayo se encontró que la adición de los inhibidores no afectó significativamente la liberación de LDH (Figura 27a-c), indicando que las células permanecen viables en presencia de estos fármacos. Por lo que la reducción en la progenie viral no está relacionada a una disminución en la viabilidad celular.

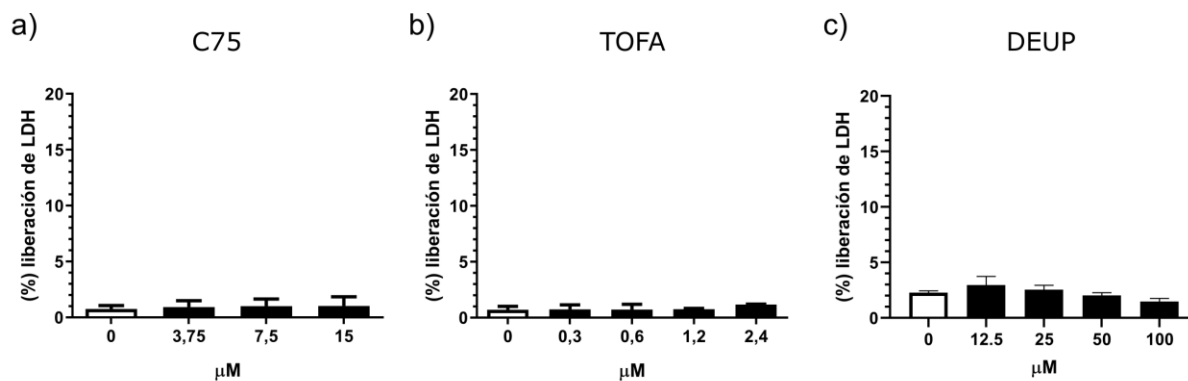


Figura 27.- Los tratamientos con C75, TOFA y DEUP no afectan la viabilidad de las células. Porcentajes de liberación de LDH en las células MA104 tratadas con diferentes concentraciones de C75 (a), TOFA (b) o DEUP (c). El porcentaje de LDH liberado se expresó en relación con los niveles LDH total (LDH intracelular más el LDH liberado). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos realizados por duplicado.

Por otra parte, para evaluar si los efectos de C75, TOFA y DEUP en la progenie viral pudiesen estar relacionados con los pasos iniciales de la replicación de rotavirus, se determinó la infectividad del virus a través de un ensayo de focos infecciosos, que detecta la síntesis de proteínas virales en las células infectadas, sin importar si se generan virus infecciosos; esto, en presencia de las diferentes concentraciones de los inhibidores. Al igual que en el ensayo de progenie, en el cual se mide la producción de partículas infecciosas, las células MA104 fueron incubadas por 30 min con diferentes concentraciones de C75, TOFA, DEUP y posteriormente infectadas con RRV (MOI de 0.025) en presencia de los respectivos inhibidores por 1 h. Al fin de este tiempo se retiró el virus no internalizado y se añadió medio nuevo con el inhibidor indicado. A las 12 hpi, las células fueron fijadas y la infectividad fue determinada mediante un ensayo de inmunoperoxidasa para detectar el número de células infectadas, equivalente al número de focos infecciosos.

De esta forma, se encontró que mientras la adición de C75 a una concentración de 3.75 μ M indujo una ligera disminución (\sim 20%) en la infectividad de rotavirus, cuando este inhibidor fue añadido a concentraciones superiores a 7.5 μ M, su presencia redujo alrededor de un 30% de la infectividad de este virus (Figura 28a). De forma similar, cuando se analizaron los efectos de TOFA, se encontró que este inhibidor disminuyó ligeramente (\sim 20%) la infectividad del virus a su concentración más alta (2.4 μ M) (Figura 28b).

Finalmente, cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de DEUP, se observó que las concentraciones de 12.5 a 50 μM indujeron una ligera disminución ($\sim 20\%$) sobre la infectividad de rotavirus, mientras que la concentración más alta (100 μM) disminuyó alrededor del 30% de la infectividad del virus (Figura 28c).

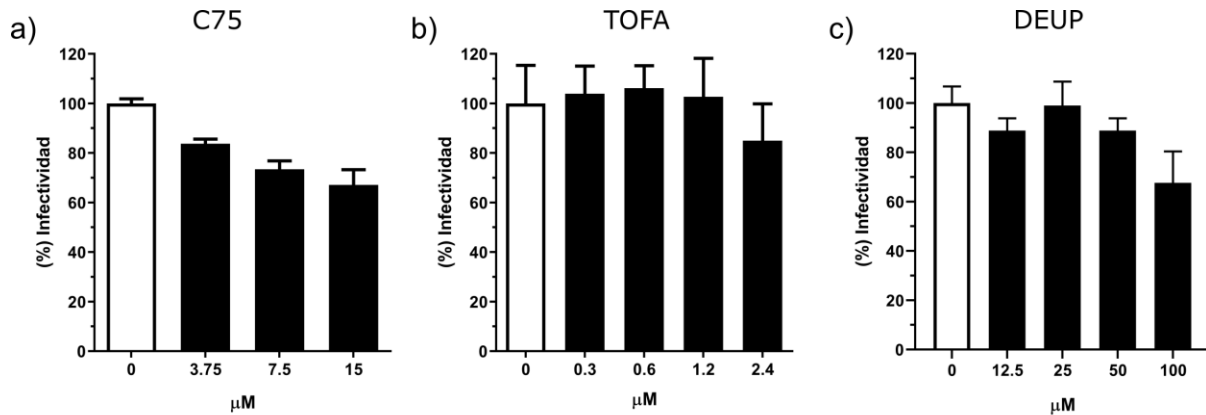


Figura 28.- El tratamiento con C75, pero no con TOFA o DEUP, inhibe la infectividad de rotavirus. Infectividad de rotavirus en células MA104 tratadas con diferentes concentraciones de C75 (a), TOFA (b) o DEUP. Los datos representan los porcentajes de infectividad, tomando como el 100% la infectividad en la condición control (ausencia de inhibidor). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos realizados por duplicado.

Por otra parte, también se analizó si el efecto de C75, TOFA y DEUP sobre la producción viral pudiese estar relacionado con la síntesis o el procesamiento de las proteínas virales. Para esto, células MA104 incubadas por 30 min con diferentes concentraciones de C75, TOFA o DEUP fueron infectadas o no con RRV. Posteriormente, en un ensayo de pulso y caza, las proteínas fueron marcadas metabólicamente mediante un pulso con [^{35}S]Met/Cis por 30 min y después se retiró el medio con el isótopo radiactivo, se lavaron las células y se dejó proseguir la infección por 2 h más (caza). Las proteínas fueron recuperadas en buffer de Laemmli 1x (Laemmli, 1970) y analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía.

Como puede observarse en la figura 29, la adición de C75 a una concentración de 15 μM indujo un incremento en la síntesis de proteínas celulares tanto en células infectadas como no infectadas. Asimismo, a diferencia de la inhibición de GBF1, se encontró que este inhibidor no afectó la movilidad electroforética de ninguna de las proteínas virales (Figura 29a). Por otro lado, también se encontró que la adición de TOFA a diferentes concentraciones no afectó la síntesis de proteínas virales ni celulares ni tampoco la movilidad electroforética de las proteínas virales (Figura 29b).

Finalmente, a diferencia de estos inhibidores, se observó que la presencia de DEUP indujo una ligera reducción de la síntesis de proteínas virales, las cuales disminuyeron de forma progresiva conforme aumentó la concentración de este fármaco (Figura 29c, comparar DMSO [Inf] y DEUP [Inf]).

No obstante, a pesar de esta afectación en las proteínas viral, la síntesis de proteínas celulares no fue afectada por DEUP (Figura 29c, comparar DMSO [Mock] y DEUP [Mock]).

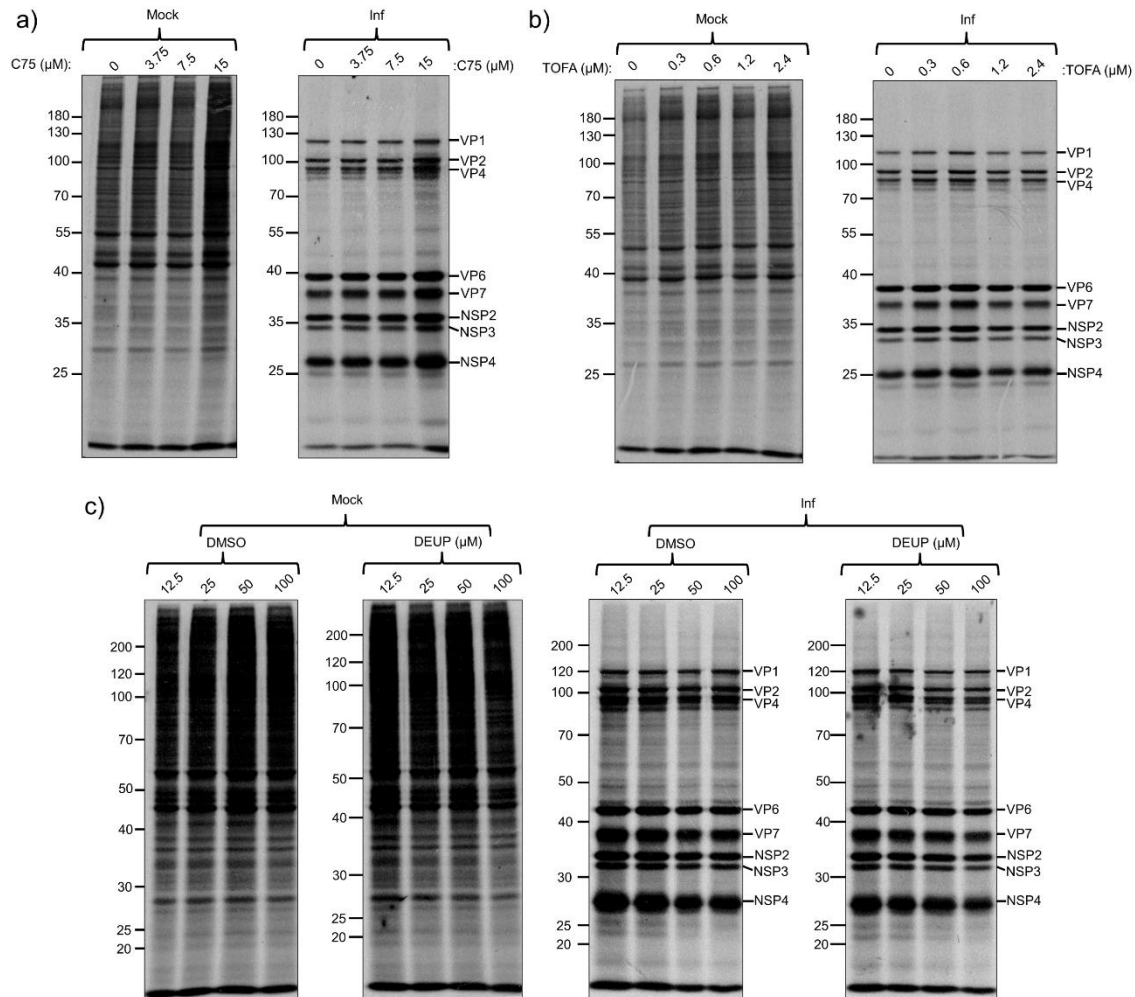


Figura 29.- Los tratamientos con C75, TOFA y DEUP no alteran la movilidad electroforética de las proteínas virales. Autoradiografía de lisados de células no infectadas (Mock) o infectadas (Inf) (RRV, MOI de 5) que fueron tratadas con distintas concentraciones de C75 (a), TOFA (b) o DEUP (c). Las proteínas celulares y virales fueron marcadas mediante un ensayo de pulso y caza utilizando $[^{35}\text{S}]\text{Met/Cis}$ (ver Metodología). El patrón de migración de las proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus se indican a la derecha.

En conjunto estos resultados indican que si bien los inhibidores C75, TOFA y DEUP inhiben la replicación de rotavirus, los mecanismos de acción de cada uno de estos fármacos difieren uno de otro. Mientras que los defectos de C75 y TOFA en la producción de virus

parecen estar relacionados a eventos posteriores a la síntesis de proteínas, para el caso de DEUP la baja en la progenie viral podría estar relacionada a una deficiencia en la traducción de proteínas.

6.7. Los viroplasmos de rotavirus son estructuras altamente organizadas

La caracterización de la estructura de los viroplasmos de rotavirus se ha realizado hasta ahora utilizando microscopía electrónica y de fluorescencia; sin embargo, debido a la dificultad de realizar inmunomicroscopía electrónica y al bajo límite de resolución que se puede alcanzar con la microscopía de fluorescencia clásica, ha sido imposible determinar los detalles de la compleja estructura organizacional de los viroplasmos.

Debido a esto, en este trabajo se realizó un análisis de la distribución de distintas proteínas virales asociadas a los viroplasmos por medio de microscopía de súper-resolución, la cual en años recientes ha permitido revelar los detalles nanoscópicos de diferentes estructuras celulares y virales (Grove, 2014; Müller y Heilemann, 2013).

Para diseccionar la organización de los viroplasmos, se eligió a la proteína NSP2 como punto de referencia para determinar la distribución espacial de las otras proteínas virales asociadas a los viroplasmos. De este modo, células MA104 crecidas en cubreobjetos de vidrio e infectadas con RRV (MOI de 1) fueron fijadas a las 6 hpi y posteriormente incubadas con distintos anticuerpos específicos para detectar la localización de la proteína NSP2 en relación con la localización de las proteínas NSP5, NSP4, VP1, VP2, VP4, VP6 o VP7, siempre analizando pares de proteínas. En el caso de VP7 se evaluó la distribución de la forma trimérica (VP7-Tri) y monomérica (VP7-Mon) de esta proteína con respecto a NSP2. Finalmente, se realizaron videos de cada combinación de proteínas, como se describió en la sección de metodología, los cuales fueron utilizados para la reconstrucción de imágenes de súper-resolución (ISR) utilizando el algoritmo 3B.

Como puede observarse en la figura 30, a diferencia de los métodos convencionales de microscopía de fluorescencia, en las ISR fue posible observar detalles de la organización estructural de los viroplasmos que no se habían observado en las imágenes limitadas por difracción obtenidas por microscopía de fluorescencia estándar. Mediante un análisis cualitativo fue posible observar que las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP6 colocalizaron de forma

parcial con la proteína NSP2 (Figura 30). Asimismo, se observó que la proteína NSP4 también colocalizó con NSP2 y que ambas proteínas parecieron ocupar la misma zona del viroplasma (Figura 30). No obstante, el resto de las proteínas evaluadas se distribuyeron en capas claramente separadas de NSP2. Por un lado, se encontró que la proteína NSP5 se ubicó hacia la parte interna de NSP2, mientras que VP4 junto con las formas trimérica y monomérica de VP7 estuvieron ubicadas hacia el exterior de NSP2, a una distancia claramente lejana de esta proteína (Figura 30).

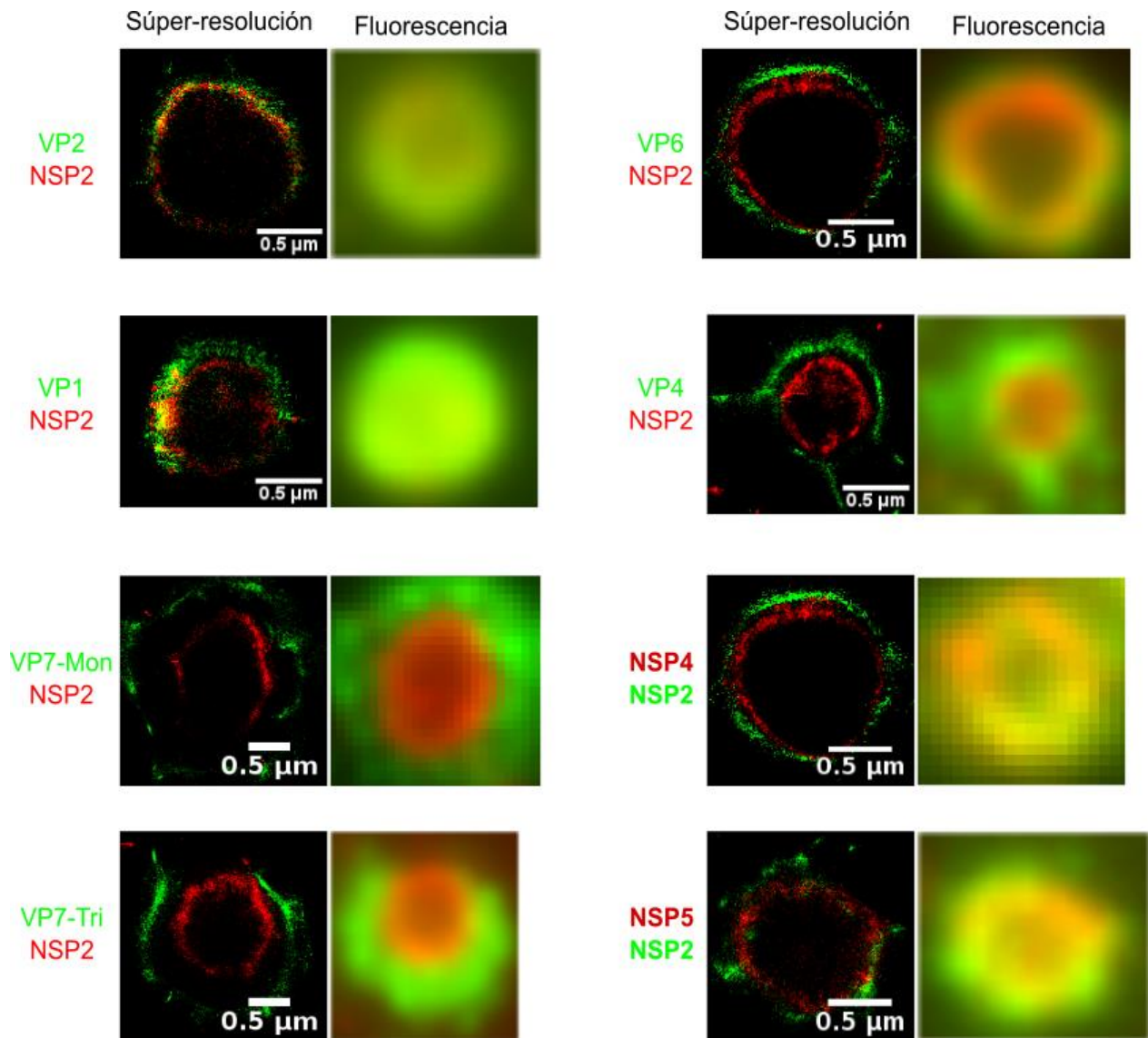


Figura 30.- Los viroplasmos de rotavirus poseen una estructura de anillos concéntricos. Imágenes de súper-resolución y de fluorescencia de viroplasmos marcados con anticuerpos específicos para las proteínas virales indicadas.

En forma general, estos resultados revelaron que dentro del viroplasma las proteínas virales se distribuyen en estructuras similares a anillos organizados en un arreglo de capas concéntricas. Basados en este modelo, se realizó un análisis cuantitativo de las posiciones espaciales de las diferentes proteínas en relación con NSP2.

Para esto, ISR como las mostradas en la figura 30, donde se tiene un único viroplasma por imagen, fueron analizadas utilizando el algoritmo “Ajuste directo mínimo cuadrado de circunferencia de viroplasma” (“VP-DLSFC” por sus siglas en inglés), el cual puede medir la distribución espacial de los componentes individuales dentro de un viroplasma mediante el ajuste de circunferencias (Garcés-Suárez, 2017). Tomando como eje el centro de la circunferencia de NSP2, con este algoritmo se cuantificó el radio y la distancia relativa de cada proteína hacia NSP2.

De acuerdo con este algoritmo se encontró que el radio medio de la distribución de NSP2 fue similar en casi todas las combinaciones probadas, a excepción de las parejas formadas con VP1 y VP2, en las cuales NSP2 tuvo un radio significativamente menor al de las demás combinaciones (Figura 31a). Debido a esto no fue posible comparar directamente la distribución de los radios de VP1 y VP2 con las demás proteínas virales acompañantes a NSP2. No obstante, al comparar los radios de las demás proteínas, se encontró que NSP5 y NSP4 tuvieron los radios más pequeños de todas las proteínas evaluadas, los cuales fueron seguidos por VP6 y VP4. Finalmente, las formas monomérica y trimérica de VP7 (VP7-Mon y VP7-Tri) tuvieron los radios más grandes de todas las proteínas evaluadas (Figura 31b).

Por otro lado, al analizar la separación relativa de cada proteína hacia NSP2 se encontró que las proteínas virales se estructuran en 5 capas principales en los viroplasma, con la proteína NSP5 localizada hacia el interior de NSP2, a una distancia de $\sim 0.048 \mu\text{m}$ (tomando a NSP2 como el origen [valor de 0]) (Figura 32). En un radio exterior a esta región, se encontró una zona ocupada por las proteínas NSP2 y NSP4, las cuales tuvieron las distribuciones más cercanas de todas las combinaciones probadas, ubicándose una de otra a una distancia de $\sim 0.003 \mu\text{m}$ (Figura 32).

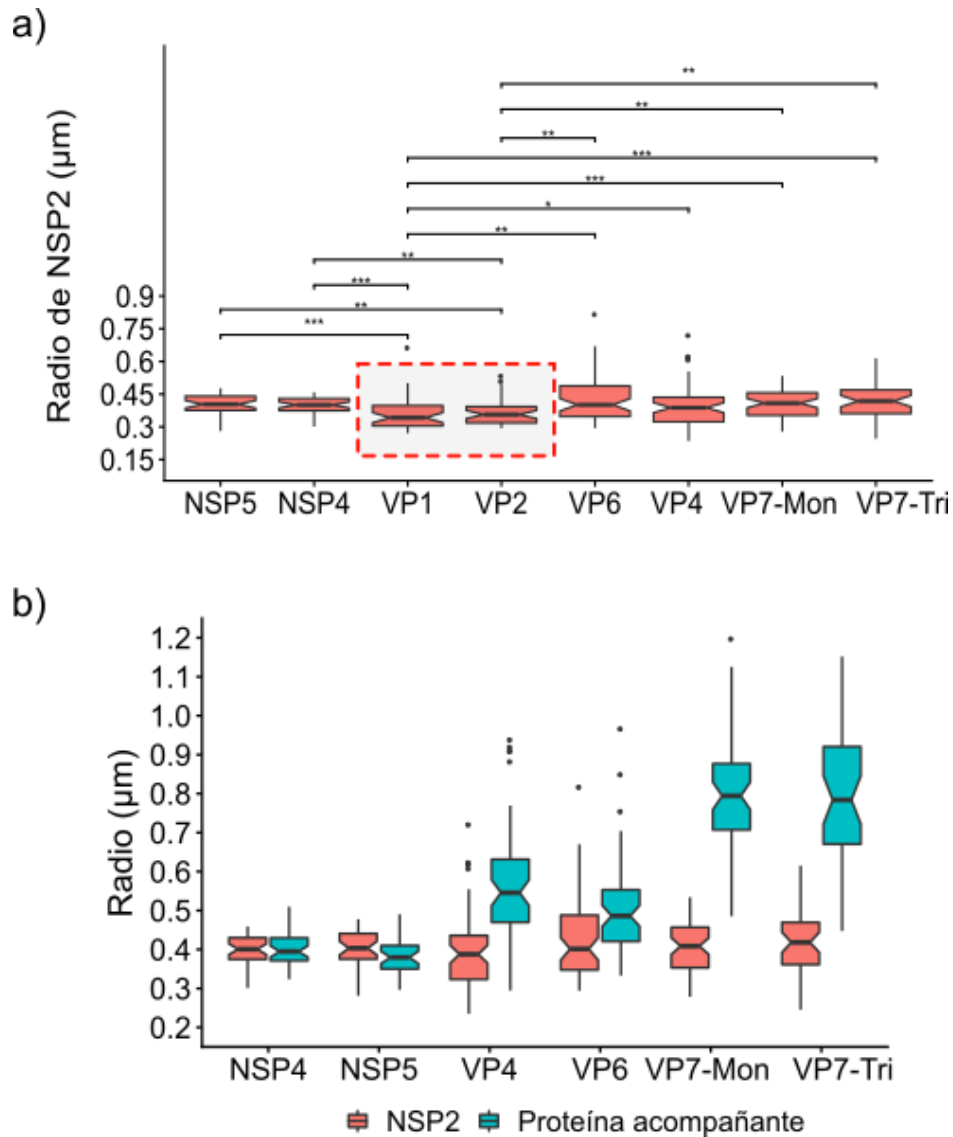


Figura 31.- Análisis cuantitativo de la distribución espacial de las proteínas virales asociadas a los viroplasmos. a) Comparación de los radios de NSP2 obtenidos para cada condición. b) Comparación de los radios de las proteínas virales indicadas (azul) junto a la proteína de referencia NSP2 (rojo). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

En un radio inmediatamente mayor del observado para NSP4 y NSP2 se encontró una región compartida por las proteínas VP1 y VP2 y VP6, las cuales se situaron a una distancia de $\sim 0.044 \mu\text{m}$, $\sim 0.04 \mu\text{m}$ y $\sim 0.06 \mu\text{m}$ hacia NSP2, respectivamente (Figura 32). Una prueba estadística de Mann-Whitney reveló que no existe una diferencia significativa entre las distancias de estas proteínas, por lo que se puede considerar que ocupan la misma capa o zona de proteínas. Hacia el exterior de esta región se localizó una capa compuesta por la proteína VP4, localizada a una distancia de $\sim 0.18 \mu\text{m}$ de NSP2 (Figura 32).

Finalmente, se encontró que la proteína más externa fue VP7, la cual se ubicó a ~ 0.38 μm de NSP2, independientemente de estar en forma monomérica (VP7-Mon) o trimérica (VP7-Tri) (Figura 32).

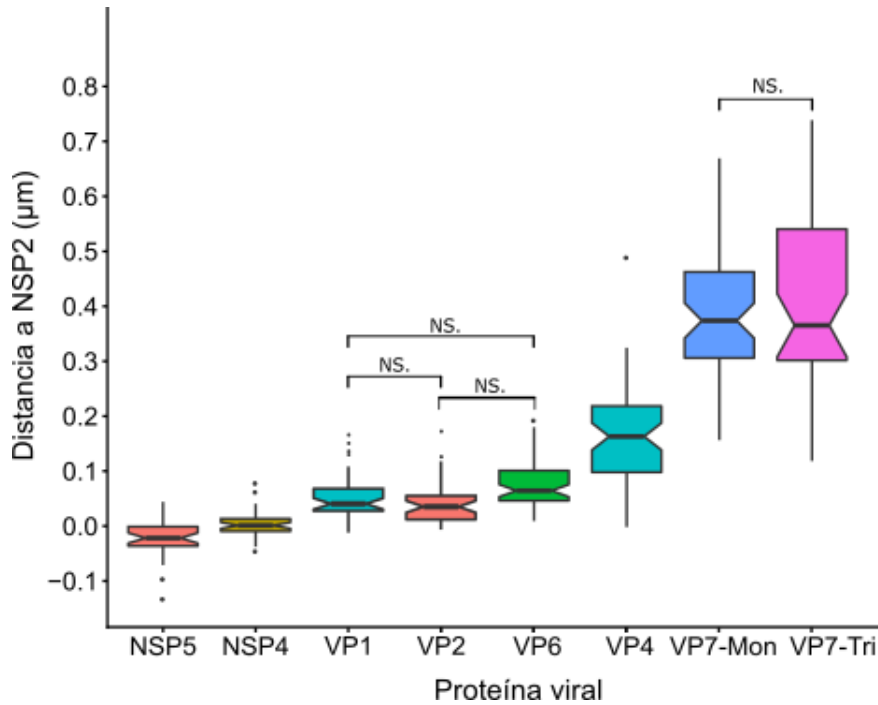


Figura 32.- Los viroplasmos de rotavirus están organizados en 5 capas concéntricas. Análisis cuantitativo de las distancias relativas de las proteínas virales indicadas hacia NSP2. Por simplicidad las comparaciones de distancias que resultaron no significativas (NS) por una prueba de Mann-Whitney se indican con una línea. El resto de las distancias fueron significativamente diferentes entre ellas para un valor de $P < 0.001$.

Por otra parte, para conocer si la organización de los viroplasmos pudiera cambiar dependiendo del tamaño de las viroplasmos, se cuantificaron los radios de las diferentes proteínas virales en viroplasmos de distintos tamaños y se comparó mediante una gráfica de dispersión la distribución de los radios obtenidos, tomando como variable independiente los valores de NSP2 (eje X) y como variable dependiente el radio de su proteína acompañante (eje Y).

De esta forma, se encontró que el radio de las diferentes proteínas acompañantes tuvo una estrecha relación lineal con el radio de NSP2, indicando que la organización de las diferentes proteínas virales es independiente del tamaño absoluto de los viroplasmos (Figura 33).

Al realizar un análisis de regresión lineal para determinar las pendientes de cada una de estas distribuciones se encontró que por cada incremento de 1 μM de NSP2, el radio de NSP5 creció aproximadamente 0.87 μM , mientras que el radio de la distribución de NSP4 incrementó en aproximadamente 0.99 μM (Figura 33, interpretación de las pendientes).

Del mismo modo, también se encontró que las proteínas VP1, VP2 y VP6 se incrementan de forma similar; 1.15, 1.12 y 1.18 μM , respectivamente, mientras que la proteína VP4 aumentó de 1.39 μM y la proteína VP7 se incrementó 1.94 μM , independientemente de que se encontrase en forma monomérica (VP7-Mon) o trimérica (VP7-Tri) (Figura 33, interpretación de las pendientes).

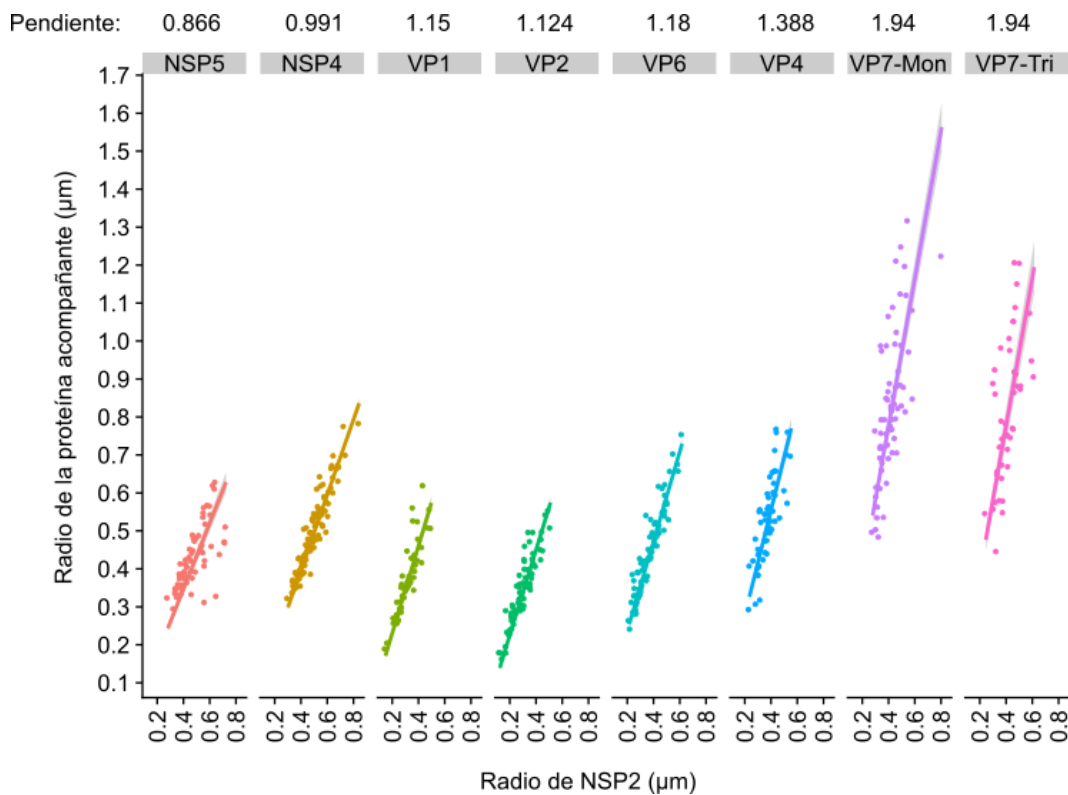


Figura 33.- La organización de los viroplasmos de rotavirus es independiente de su tamaño. Análisis de regresión lineal simple para cada proteína viral acompañante de NSP2. En los ocho sub-páneos, el eje de las X (variable independiente) representa el radio de NSP2, mientras que el eje de las Y (variable dependiente) representa el radio de la proteína acompañante indicada en la parte superior. La pendiente para cada modelo de regresión lineal se indica en la parte superior.

Las tasas de crecimiento del radio de las proteínas virales parecen concordar con las posiciones espaciales de cada proteína hacia NSP2, ya que mientras NSP5 crece proporcionalmente a una tasa más pequeña que NSP2, la proteína NSP4 tiene un crecimiento

directamente proporcional a NSP2. Estos resultados apoyan la idea de que NSP5 se ubica en la parte interna de NSP2, mientras que NSP4 ocupa la misma zona que NSP2.

Del mismo modo, la similitud de las tasas de crecimiento de VP1, VP2 y VP6 apoya la propuesta de que estas proteínas comparten una misma región. Finalmente, el hecho de que VP4 y VP7 posean las tasas de crecimiento más grandes de todas las proteínas concuerda con sus ubicaciones hacia el exterior del viroplasma.

Por otro lado, para confirmar que la organización estructural observada en los viroplasmas fuese independiente de la proteína de referencia elegida, se analizó la distribución de VP6 y VP4 tomando como referencia la proteína NSP5. De esta forma, se encontró que al igual que en los experimentos anteriores el radio de VP6 fue significativamente menor al radio de VP4 (Figura 34a). Dado que los radios de NSP5 de estas combinaciones fueron similares, estos resultados indican que VP6 se encuentra más cercano a NSP5, lo cual fue confirmado al calcular las distancias de VP6 ($\sim 0.096 \mu\text{M}$) y VP4 ($\sim 0.227 \mu\text{M}$) hacia esta proteína (Figura 34b). De manera interesante, la distancia de NSP5 a VP6 ($\sim 0.096 \mu\text{M}$) obtenida fue similar a la suma de la distancia de NSP5 a NSP2 ($\sim 0.048 \mu\text{M}$) más la distancia de NSP2 a VP6 ($\sim 0.06 \mu\text{M}$) obtenidas cuando NSP2 se usó de referencia.

Finalmente, el análisis de la distribución de los radios en las combinaciones NSP5-VP6 y NSP5-VP4 para viroplasmas de distintos tamaños demostró que existe una estrecha relación lineal entre los tamaños de NSP5 con el de VP6 y VP4, encontrándose que por cada incremento de $1 \mu\text{m}$ en NSP5, VP6 y VP4 aumentaban $1.27 \mu\text{m}$ y $1.62 \mu\text{m}$, respectivamente (Figura 34c, interpretación de las pendientes). Este resultado indica que al igual que con NSP2, la organización de VP6 y VP4 entorno a NSP5 es independiente del tamaño absoluto de las viroplasmas.

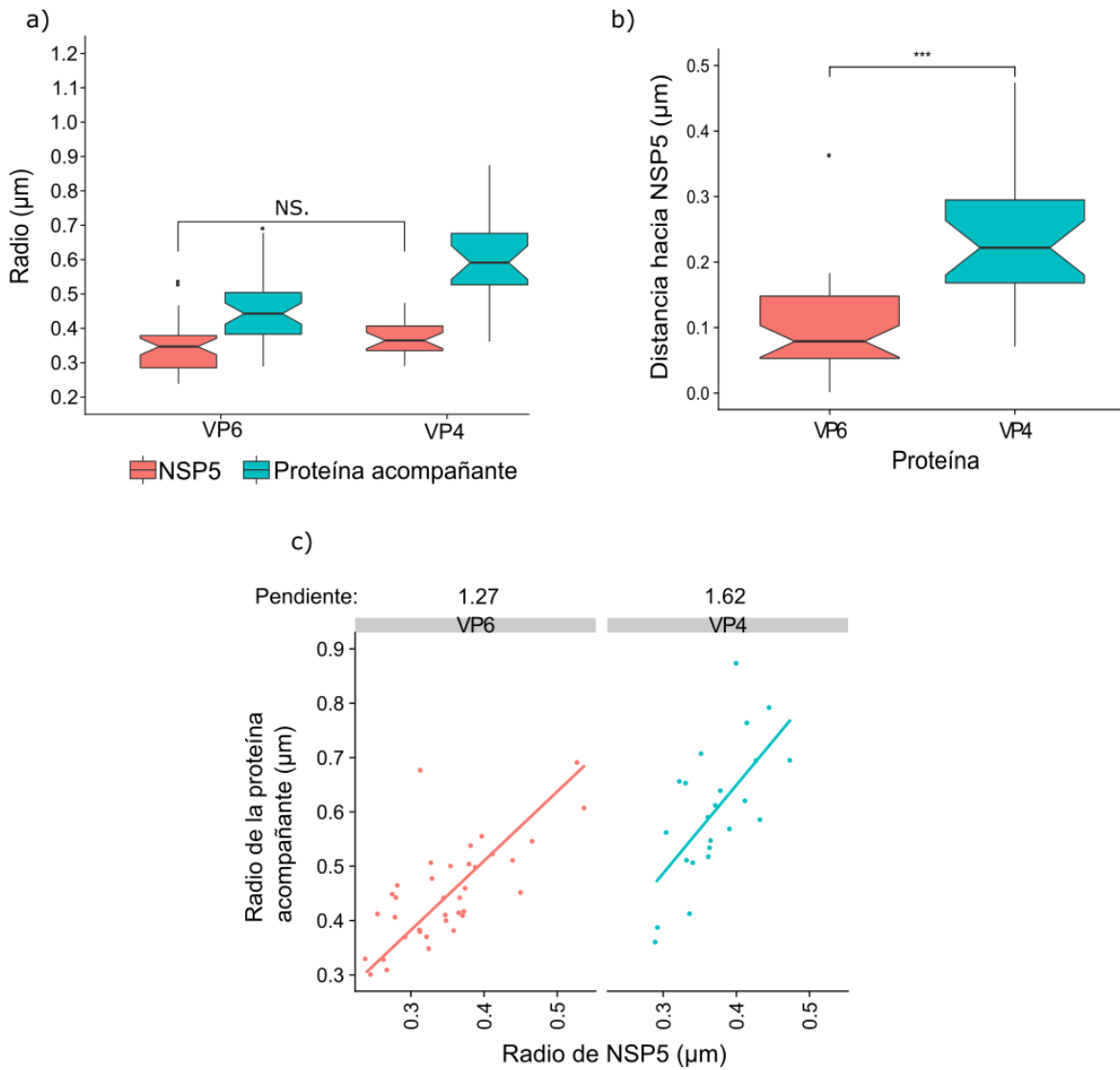


Figura 34.- La organización los viroplasmata es independiente de la proteína de referencia elegida. a) Comparación de los radios de las proteínas virales indicadas (azul) junto a la proteína de referencia NSP5 (rojo). b) Análisis cuantitativo de las distancias relativas de las proteínas virales indicadas hacia NSP5. c) Análisis de regresión lineal simple para cada proteína viral acompañante de NSP5. En los dos sub-páneles, el eje de las X representa el radio de NSP2, mientras que el eje de las Y representa el radio de la proteína acompañante indicada en la parte superior. La pendiente para cada modelo de regresión lineal se indica en la parte superior.

7. DISCUSIÓN

Las células eucariotas utilizan elaborados sistemas de transporte para controlar el tráfico de proteínas entre sus diferentes organelos. Dentro de estos sistemas, la maquinaria COPI/Arf1 es un componente importante. Asimismo, en las últimas décadas se ha reportado que esta maquinaria también es esencial para la replicación de virus con genoma de RNA pertenecientes a diferentes familias.

Durante mi tesis de maestría encontré que el transporte COPI/Arf1 es importante para la morfogénesis de rotavirus, ya que su inhibición farmacológica con BFA y GCA provoca un bloqueo en el ensamble de la capa externa del virus (Martínez Guevara, 2015). Si bien la causa de este bloqueo es desconocida, en el presente trabajo se encontró que la inhibición en la morfogénesis de estos virus no está relacionada con un defecto en la gemación de las DLPs hacia el interior del RE ni con la formación de las partículas intermediarias envueltas en una capa de lípidos, sino que es debida a una alteración en la trimerización de la proteína de superficie VP7, la cual se ha propuesto que es esencial para la maduración de las partículas envueltas y el ensamblado de la capa externa del virus (Chen et al., 2009; López et al., 2005).

Considerando que los tratamientos con BFA y GCA alteran la movilidad electroforética de la proteína VP7 (Martínez Guevara, 2015; Mirazimi et al., 1996), era posible que el bloqueo en la trimerización de VP7 pudiera deberse a la modificación de esta proteína. Por esta razón exploramos el tipo de modificación que pudiera estar alterando su movilidad. Mediante el uso de diferentes endoglicosidasas, se encontró que si bien los carbohidratos unidos a VP7 mediante N-glicosilación sufren una alteración en su procesamiento en presencia de BFA y GCA, esta modificación contribuye sólo parcialmente al cambio en la movilidad de VP7. Del mismo modo, se encontró que el cambio en la movilidad electroforética de esta proteína tampoco parece estar relacionado a una posible O-glicosilación o fosforilación. Una interesante posibilidad, es que la modificación de esta proteína pudiera estar relacionada con un bloqueo en la remoción del péptido líder de la glicoproteína (primeros 50 aminoácidos), el cual dirige a VP7 hacia el RE y es removido co-traduccionalmente durante su síntesis (Stirzaker et al., 1987).

Por otro lado, el hallazgo de que tanto BFA como GCA no afectan el reconocimiento de VP7 por el anticuerpo M60, parece indicar que la alteración post-traduccional de VP7 no altera

la formación de los puentes disulfuro ni el plegamiento de esta proteína. Esto, debido a que se ha demostrado que el anticuerpo M60 reconoce a VP7 solamente cuando todos sus puentes disulfuro se han formado correctamente y la proteína se encuentra bien plegada (Maruri-Avidal et al., 2008; Mirazimi y Svensson, 2000). Esta observación es apoyada por el hecho de que VP7 mantiene su localización en el RE en presencia de BFA (colocalización con la proteína mTurquoise2-ER), lo que sugiere que la falta de trimerización de esta proteína no es debido a una alteración en su plegamiento ni a una alteración en su localización en el RE.

Una posibilidad que no fue evaluada es que una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular inducida por los fármacos pudiera inhibir la trimerización de VP7, ya que la estabilidad de los trímeros de esta proteína depende de la presencia de iones de calcio (Ca^{2+}) (Dormitzer et al., 2000; Yeager et al., 1990). Lo anterior, debido a que se ha reportado que BFA puede inhibir el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular que se induce por la infección de rotavirus (Ruiz et al., 2005).

Por otra parte, ya que en este trabajo también se encontró que la presencia de NSP4 es esencial para favorecer (directa o indirectamente) la trimerización de VP7, también es factible que el bloqueo en el ensamblado de la capa externa pudiera ser debido a la alteración que NSP4 sufre en presencia de BFA y GCA (Martínez Guevara, 2015; Mirazimi et al., 1996). Esta idea concuerda con observaciones previas en donde se describió que la adición de tunicamicina (un inhibidor de la N-glicosilación) inhibe la replicación de un virus mutante de Sa11-CL28 que posee una proteína VP7 sin glicosilación, al restringir la maduración de las partículas intermediarias envueltas por medio de la inhibición en la glicosilación de NSP4 (Petrie et al., 1983).

En conjunto, el bloqueo en la trimerización de VP7 podría depender ya sea la modificación post-traducciona que sufre VP7, una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular o la alteración post-traducciona de NSP4, aunque no se descarta la posibilidad de que pudieran ser una combinación de todos estos factores.

En relación con el papel de la maquinaria COPI/Arf1 en la replicación de diferentes virus de RNA, si bien el mecanismo específico no es claro, evidencias recientes han demostrado que el intercambiador GBF1, que regula el inicio del transporte mediado por esta maquinaria, es

esencial para diversos procesos como la replicación y transcripción del genoma viral, la formación de los complejos de replicación, la expresión de proteínas virales y el ensamblado de nuevos virus (ver Tabla 1).

Al igual que estos reportes, a través de RNAi se encontró que la replicación de rotavirus también es dependiente del intercambiador GBF1. Este hallazgo, junto con la observación de que el silenciamiento de GBF1 induce un cambio en la movilidad electroforética de VP7 y NSP4, sugieren que la inhibición en la morfogénesis de rotavirus inducida por BFA y GCA es debido al bloqueo específico de la actividad de este factor. Esto fue confirmado mediante ensayos de transfección en donde se encontró que la sobreexpresión de GBF1 es capaz de revertir los efectos de la inhibición inespecífica mediada por BFA. Del mismo modo, los ensayos con las variantes truncadas de mVenus-GBF1/795 revelaron que el extremo C-terminal de GBF1 no es esencial para la replicación de rotavirus, mientras que el extremo N-terminal sí lo es. Estudios previos han reportado que el extremo N-terminal de GBF1 es importante para la replicación de CVB3 y poliovirus, ya que permite la interacción de GBF1 con la proteína viral 3A involucrada en la formación de los centros de replicación de estos virus (Belov et al., 2010, 2008; Wessels et al., 2007, 2006a). Debido a esto, es posible que la importancia del extremo N-terminal para la replicación de rotavirus pueda estar relacionada a la interacción de GBF1 con alguna proteína viral o celular importante para su replicación. En este sentido, un probable candidato celular podría ser la proteína Rab1b, la cual se ha descrito que interacciona con el extremo N-terminal de GBF1 y puede modular la actividad de este factor en la ruta secretoria (Monetta et al., 2007).

Por otro lado, el descubrimiento de que las variantes de GBF1 que no pueden inducir el intercambio de nucleótidos (mVenus-GBF1/795/E794K y mVenus-GBF1/795/7A), no pudieron rescatar la replicación de rotavirus en presencia de las drogas, confirma que ésta depende de la actividad del dominio Sec7, por lo que, si bien por RNAi se descubrió que la activación de Arf1 es dispensable, es probable que rotavirus requiera de la activación de otros sustratos de GBF1, como Arf4 y Arf5 (Anders y Jürgens, 2008), los cuales pudieran compensar las funciones de Arf1, cuando esta proteína es silenciada.

En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad de intercambiador de nucleótidos de GBF1 es importante para el correcto procesamiento de VP7 y NSP4 que permite el ensamblado de estas proteínas de la capa externa del virus para producir partículas virales

infecciosas. Tomando en cuenta las funciones de GBF1 en el transporte del Golgi-RE y la estrecha relación de la morfogénesis de rotavirus con el RE, estos resultados parecen indicar que el transporte Golgi-RE es un proceso relevante para la morfogénesis del virus. Sin embargo, una función desconocida de GBF1 tampoco puede ser descartada. Del mismo modo, las recientes observaciones acerca de la estrecha relación entre la replicación de rotavirus y las LDs (Cheung et al., 2010), junto con las funciones que GBF1 ha demostrado tener para la función de estos organelos, también sugieren que la importancia de GBF1 para rotavirus podría estar ligada a las LDs. Sin embargo, la adición de BFA no afectó la colocalización entre la proteína NSP2 y los lípidos neutros componentes de las LDs teñidos con Bodipy 493/503, lo que sugiere que el defecto en la morfogénesis del virus en presencia de la droga no parece estar relacionado con una alteración en la formación de las LDs. No obstante, cabe la posibilidad de que en presencia de BFA, la función de las LDs asociadas a los viroplasmos pudiera ser defectuosa; por ejemplo, por la carencia de alguna proteína celular no transportada a estos organelos que pudiera ser importante para sostener la replicación de rotavirus.

En este sentido, cuando se evaluó la relevancia del metabolismo de lípidos por medio de la inhibición farmacológica o por RNAi de enzimas importantes para la síntesis y movilización de lípidos, se encontró que la replicación de este virus depende estrechamente de la generación de ácidos grasos libres ya sea que estos provengan de la síntesis *de novo* o de la acción de lipasas. Tomando en cuenta que se encontró que el importe de ácidos grasos libres a la mitocondria para la β -oxidación no es importante para rotavirus, es probable que los ácidos grasos libres sean entonces relevantes para la generación de fosfolípidos necesarios para la síntesis de membranas, de modo que se pueda sostener la generación de las partículas intermediarias envueltas en el RE.

Por otra parte, dado que la inhibición del metabolismo de lípidos no alteró la movilidad electroforética de las proteínas virales, estos resultados parecen indicar que la posible alteración electroforética de VP7 y NSP4 durante la inhibición de GBF1 no está relacionada con una alteración en el metabolismo de lípidos.

Finalmente, en este trabajo también se realizó un análisis de la organización nanoscópica de las proteínas virales asociadas a las viroplasmos de rotavirus mediante microscopía de súper-resolución. A través de esta nueva metodología se pudo observar, por primera vez, que las

proteínas virales dentro de los viroplasma, incluyendo a VP4 y VP7, están organizadas en un arreglo constituido por 5 capas concéntricas. En esta estructura NSP5 constituye la capa más interna del viroplasma, la cual está seguida de una capa compuesta por NSP2 y NSP4. Externas a estas proteínas se ubicaron las proteínas VP1, VP2 y VP6, las cuales parecen estar contenidas en una región espacial compartida, definida por radios muy similares desde el centro del viroplasma. Finalmente, en la zona más externa en la estructura del viroplasma se observaron dos capas consecutivas, una formada por VP4 y una por VP7.

El análisis de viroplasma de diferentes tamaños reveló que la distribución espacial descrita para los diferentes componentes del viroplasma se conserva independiente del tamaño absoluto del viroplasma. Tomando en cuenta las tasas de crecimiento de los radios de las proteínas virales (ver figura 33, pendientes), estos resultados parecen indicar que el crecimiento los viroplasma se realiza mediante un proceso en el cual las diferentes capas crecen de manera concertada mediante un proceso progresivo que va del interior hacia el exterior del viroplasma.

Si bien los resultados encontrados sugieren que la mayor parte de las proteínas virales asociadas con los viroplasma están organizadas en capas específicas, esta organización no excluye la posibilidad de que las diferentes proteínas virales interaccionen entre sí, ya que por diferentes métodos bioquímicos se ha encontrado que existe una interacción entre los diversos componentes del viroplasma (Afrikanova et al., 1998; Berois et al., 2003; Eichwald et al., 2004; Poncet et al., 1997). En este sentido, se puede observar que en las imágenes de súper-resolución existen ciertas zonas de sobre posición entre las diferentes capas de proteínas, las cuales podrían ser relevantes para la replicación del genoma y el ensamblado del virus.

Por otro lado, la posición de NSP5 hacia la parte más interna del viroplasma, parece sugerir que esta proteína constituye el núcleo de estos organelos virales, posiblemente formando la base sobre la cual se inicia la biogénesis de los viroplasma. A diferencia de este hallazgo, el descubrimiento de que NSP4 se ubica hacia el interior de viroplasma resulta totalmente inesperado, dado que NSP4 es una proteína integral de la membrana del RE, la cual se ha demostrado que interacciona con VP4 y VP7 (Maass y Atkinson, 1990). Sin embargo, en favor de la localización interna de NSP4, se ha observado que el silenciamiento de la expresión de esta proteína reduce significativamente el tamaño y número de viroplasma (López et al., 2005) (este trabajo, ver figura 15), perturbando la asociación de VP2, VP4, VP6 y VP7, proteínas que

demostramos se encuentra más hacia el exterior de estas estructuras en relación con NSP4 (López et al., 2005) (ver figura 32); En contraste con esto, y de acuerdo a lo esperado, el silenciamiento de la expresión de NSP4 no afecta la localización de las proteínas NSP2 y NSP5 (López et al., 2005), localizadas más hacia el interior del viroplasma (ver figura 32). Del mismo modo, tomando en cuenta que se ha propuesto que la biogénesis de los viroplasmos ocurre en la superficie de las LDs (Cheung et al., 2010) y que la formación de las LDs se origina a partir de la acumulación de lípidos en la membrana del RE (Walther y Farese, 2012), una interesante posibilidad que podría explicar la localización interna de NSP4 es que durante la formación de LDs en la membrana del RE, la proteína NSP4 sea incluida en la monocapa lipídica que da origen a las LDs y se convierta entonces en un componente de la superficie de las mismas. De este modo, las LDs decoradas con NSP4 podrían ser utilizadas para nuclear la formación de viroplasmos, quedando la glicoproteína viral ubicada hacia el interior de estos organelos (Figura 35).

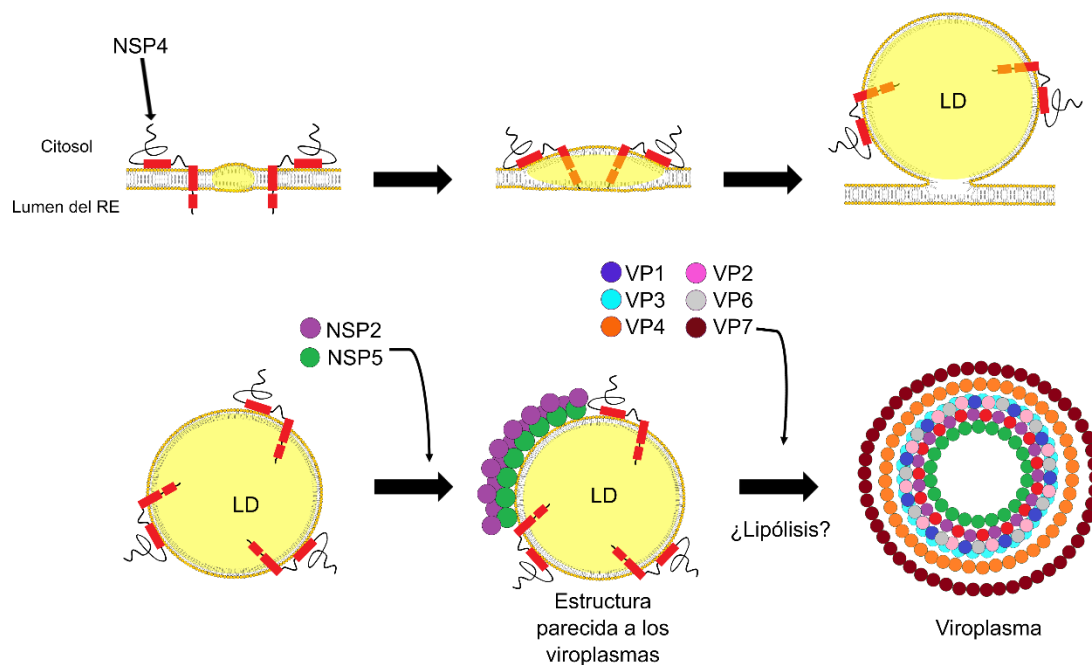


Figura 35.- Modelo de incorporación de NSP4 en el interior de los viroplasmos. La proteína NSP4 localizada en la membrana del RE de las células infectadas es incorporada en las LDs nacientes que se forman a partir de la acumulación de lípidos neutros entre la bicapa de lípidos (amarillo) (fila superior). Una vez que la LD es liberada de la membrana del RE, esta es utilizada como un andamio sobre el cual se adicionan el resto de las proteínas virales que dan lugar a estructuras parecidas a viroplasmos, las cuales sufren un proceso de maduración (posiblemente lipólisis) en cual se remueven los lípidos neutros de las LDs para formar los viroplasmos finales, en los cuales la proteína NSP4 queda ubicada en el interior estas estructuras (fila inferior).

Si bien este modelo parece explicar la localización interna de NSP4, esta distribución no se contrapone a la ubicación de esta proteína en la membrana del RE, ya que un reporte previo describió que NSP4 puede distribuirse de tres formas distintas: una forma asociada al RE, otra asociada a los viroplasmos y una última menos predominante asociada al compartimiento ERGIC (Berkova et al., 2006).

Por otro lado, la localización de VP1, VP2 y VP6 en la misma capa del viroplasma parece indicar que es en esta zona media de los viroplasmos donde se realiza el ensamblado de las nuevas DLPs. También, la posición de VP4 seguida de VP7 en la parte más externa del viroplasma concuerda con el modelo propuesto de la morfogénesis de rotavirus, en el cual primero se debe ensamblar VP4 sobre las DLPs para posteriormente permitir la asociación de VP7, de modo que el ensamblado de esta proteína asegure VP4 en su posición final (Trask y Dormitzer, 2006). Finalmente, el hallazgo de que la forma trimérica y monomérica de VP7 estuvieron a la misma distancia de NSP2 parece indicar que la formación de los trímeros de VP7 tiene lugar en el RE donde se ubica la forma monomérica de esta proteína.

En conjunto, los resultados del análisis de microscopía de súper-resolución revelaron que, contrario a la visión clásica de los viroplasmos como una inclusión de proteínas sin un aparente orden, estos complejos virales son en realidad estructuras altamente organizadas en las cuales las proteínas parecen estar dispuestas en la posición adecuada para permitir el correcto ensamblado de los nuevos virus.

8. CONCLUSIONES

1. La inhibición en la producción de TLPs inducida por los tratamientos de BFA y GCA no está relacionada a un bloqueo en la gemación de DLPs hacia el interior del RE.
2. La alteración en la movilidad electroforética de VP7 en presencia de BFA y GCA no está relacionada a cambios en la estructura de su cadena de carbohidratos (N- u O-glicosilación), ni a un proceso de fosforilación.
3. El bloqueo en la formación de TLPs inducido por BFA y GCA está relacionado a un defecto en la trimerización de VP7.
4. La presencia de NSP4 es esencial (directa o indirectamente) para la trimerización de VP7.
5. La proteína de GBF1 (blanco de BFA y GCA) es esencial para la replicación de rotavirus y el procesamiento post-traducciona l de VP7 y NSP4.
6. La activación de la GTPasa Arf1 es dispensable para la replicación de rotavirus.
7. La infección por rotavirus requiere del extremo N-terminal de GBF1.
8. La actividad de intercambiador de nucleótidos del dominio Sec7 de GBF1, así como la asociación de GBF1 con proteínas Arfs, son importantes para la replicación de rotavirus.
9. BFA no altera la colocalización de los viroplasm as de rotavirus con las LDs.
10. La inhibición farmacológica o por RNAi de la síntesis de lípidos, o la actividad de lipasas, inhibe significativamente la producción viral.
11. Los viroplasm as de rotavirus poseen una morfología organizada en 5 capas concéntricas formadas por las siguientes proteínas: NSP5 (capa 1); NSP2 y NSP4 (capa 2); VP1, Vp2 y VP6 (capa 3); VP4 (capa 4) y VP7 (capa 5).
12. La organización espacial de los viroplasm as de rotavirus es independiente del tamaño absoluto del viroplasma.

9. PERSPECTIVAS

1. Evaluar si la modificación en movilidad electroforética de VP7 en presencia de los fármacos pudiera ser consecuencia de alteraciones en su extremo N-terminal.
 - a. Utilizando variantes truncadas de VP7 a partir de su extremo N-terminal.
 - b. Empleando un anticuerpo dirigido contra el péptido señal de VP7 que permita detectar la posible presencia de este péptido en la proteína VP7 modificada.
2. Determinar los niveles de Ca^{2+} en el RE durante los tratamientos con BFA o GCA, así como durante el silenciamiento de GBF1.
3. Determinar si la modificación de NSP4 podría evitar la formación del complejo heterooligomérico formado por esta proteína junto con VP4 y VP7.
4. Analizar si el silenciamiento individual o combinado de las diferentes proteínas Arfs puede bloquear el ciclo de replicación del virus.
5. Evaluar si el bloqueo en la actividad de GBF1 puede alterar la colocación de proteínas y enzimas ubicadas en la superficie de las LDs.
6. Analizar por microscopía de súper-resolución la distribución del resto de las proteínas virales y celulares para las cuales se ha reportado una asociación con los viroplasmos de rotavirus.
7. Evaluar por microscopía de súper-resolución la distribución de marcadores de la membrana del RE con respecto a los viroplasmos de rotavirus, de modo que se pueda conocer la posición espacial de los viroplasmos con respecto al RE.
8. Estudiar la distribución de las proteínas virales en los viroplasmos a diferentes tiempos post-infección, para poder conocer como es el proceso de biogénesis y maduración de estos complejos virales.
9. Realizar un análisis en tres dimensiones de los viroplasmos de rotavirus mediante microscopía de súper-resolución, de modo que se pueda obtener una visión más precisa de la distribución espacial de las proteínas virales.

10. REFERENCIAS

1. Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C., Burrone, O.R. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J. Gen. Virol.* 79, 2679–2686.
2. Altenburg, B.C., Graham, D.Y., Kolb Estes, M. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J. Gen. Virol.* 46(1), 75–85.
3. Anders, N., Jürgens, G. (2008). Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(21), 3433–3445.
4. Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., Chabre, M. (1997). N-Terminal hydrophobic residues of the G-Protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, 36(15), 4675–4684.
5. Aoki, S.T., Settembre, E.C., Trask, S.D., Greenberg, H.B., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R. (2009). Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*, 324(5933), 1444–1447.
6. Au, K.S., Chan, W.K., Burns, J.W., Estes, M.K. (1989). Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J. Virol.*, 63(11), 4553–4562.
7. Au, K.S., Mattion, N.M., Estes, M.K. (1993). A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein ns28. *Virology*, 194(2), 665–673.
8. Baybutt, H.N., McCrae, M.A. (1984). The molecular biology of rotaviruses VII. Detailed structural analysis of gene 10 of bovine rotavirus. *Virus Res.*, 1(7), 533–541.
9. Beck, R., Ravet, M., Wieland, F.T., Cassel, D., Cassel, D. (2009). The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Lett.*, 583(17), 2701–2709.
10. Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D.S., Oliver, B. (2008). COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol.*, 6(11), 2530–2549.
11. Belov, G.A., Ehrenfeld, E. (2007). Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle*, 6(1), 36–38.
12. Belov, G.A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C.L., Ehrenfeld, E. (2008). A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog.*, 4(11), e1000216.

13. Belov, G.A., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., Ehrenfeld, E. (2010). Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell. Microbiol.*, 12(10), 1463–1479.
14. Bergmann, C.C., Maass, D., Poruchynsky, M.S., Atkinson, P.H., Bellamy, A.R. (1989). Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, 8(6), 1695–1703.
15. Berkova, Z., Crawford, S.E., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A.P., Estes, M.K. (2006). Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. *J. Virol.*, 80(12), 6061–6071.
16. Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J. Virol.*, 77(3), 1757–1763.
17. Bhatt, J.M., Viktorova, E.G., Wyrozumska, P., Lin, H., Belov, G.A., Busby, T., Kahn, R.A., Sztul, E., Wright, J., Lee, E., Newman, L.E. (2015). Oligomerization of the Sec7 domain Arf guanine nucleotide exchange factor GBF1 is dispensable for Golgi localization and function but regulates degradation. *Am. J. Physiol. Physiol.*, 310(6), C456–C469.
18. Bouvet, S., Golinelli-Cohen, M.-P., Contremoulins, V., Jackson, C.L. (2013). Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J. Cell Sci.*, 126(Pt 20), 4794–4805.
19. Cabral-Romero, C., Padilla-Noriega, L. (2006). Association of rotavirus viroplasms with microtubules through NSP2 and NSP5. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(6), 603–11.
20. Campagna, M., Budini, M., Arnoldi, F., Desselberger, U., Allende, J.E., Burrone, O.R. (2007). Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1 α is associated with the formation of viroplasms with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. *J. Gen. Virol.*, 88(Pt 10), 2800–2810.
21. Carreño-Torres, J.J., Gutiérrez, M., Arias, C.F., López, S., Isa, P. (2010). Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Viol. J.*, 7, 350.
22. Chasey, D. (1977). Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. *J. Gen. Virol.*, 37(3), 443–451.

23. Chavrier, P., Ménétreay, J. (2010). Toward a structural understanding of Arf family: effector specificity. *Structure*, 18(12), 1552–1558.
24. Chen, J., Settembre, E., Aoki, S., Zhang, X., Bellamy, A., Dormitzer, P. (2009). Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(26), 10644–10648.
25. Chen, J., Wu, X., Yao, L., Yan, L., Zhang, L., Qiu, J., Liu, X., Jia, S., Meng, A. (2017). Impairment of cargo transportation caused by gbf1 mutation disrupts vascular integrity and causes hemorrhage in zebrafish embryos. *J. Biol. Chem.*, 292(6), 2315–2327.
26. Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C.F., Courousse, N., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Keshavan, N., Lever, A., Desselberger, U. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol.*, 84(13), 6782-6798
27. Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., Vallese, F., Filadi, R., Wagner, T., Pozzan, T., Pizzo, P., Scorrano, L., Brini, M., Cali, T. (2018). SPLICS: A split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ.*, 25(6), 1131–1145.
28. Claude, A., Zhao, B.-P., Kuziemsky, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.-P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M., Melançon, P. (1999). GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation Factor 5. *J. Cell Biol.*, 146(1), 71–84.
29. Crawford, S.E., Ramani, S., Tate, J.E., Parashar, U.D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M.A., Greenberg, H.B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M.K. (2017). Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 3, 17083.
30. de Wilde, A.H., Wannee, K.F., Scholte, F.E.M., Goeman, J.J., ten Dijke, P., Snijder, E.J., Kikkert, M., van Hemert, M.J. (2015). A kinome-wide small interfering RNA screen identifies proviral and antiviral host factors in severe acute respiratory syndrome coronavirus replication, including double-stranded RNA-activated protein kinase and early secretory pathway proteins. *J. Virol.*, 89(16), 8318–8333.

31. Dempsey, G.T., Vaughan, J.C., Chen, K.H., Bates, M., Zhuang, X. (2011). Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods*, 8(12), 1027–1040.
32. Donaldson, J.G., Jackson, C.L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(6), 362–375.
33. Dormitzer, P.R., Greenberg, H.B., Harrison, S.C. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology*, 277(2), 420–428.
34. Dorobantu, C.M., Ford-Siltz, L.A., Sittig, S.P., Lanke, K.H.W., Belov, G.A., van Kuppeveld, F.J.M., van der Schaar, H.M. (2015). GBF1- and ACBD3-independent recruitment of PI4KIII β to replication sites by rhinovirus 3A proteins. *J. Virol.*, 89(3), 1913–1918.
35. Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A.S., Schraner, E.M., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O.R., Ackermann, M. (2012). Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS One*, 7(10), e47947.
36. Eichwald, C., Rodriguez, J.F., Burrone, O.R. (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.*, 85(Pt 3), 625–634.
37. Ellong, E.N., Soni, K.G., Bui, Q.T., Sougrat, R., Golinelli-Cohen, M.P., Jackson, C.L. (2011). Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the arf1 activator GBF1. *PLoS One*, 6(7), e21889.
38. Estes, M.K., Graham, D.Y., Ramig, R.F., Ericson, B.L. (1982). Heterogeneity in the structural glycoprotein (VP7) of simian rotavirus SA11. *Virology*, 122(1), 8–14.
39. Estes, M.K., Greenberg, H.B. (2013). Rotaviruses, en: Knipe, M.D., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, US., pp. 1347–1401.
40. Farhat, R., Ankavay, M., Lebsir, N., Gouttenoire, J., Jackson, C.L., Wychowski, C., Moradpour, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Cocquerel, L. (2018). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cell. Microbiol.*, 20(1), e12804.

41. Ferlin, J., Farhat, R., Belouzard, S., Cocquerel, L., Bertin, A., Hober, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y. (2018). Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 99(8), 1086–1096.
42. Freeze, H. (1999). Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked oligosaccharides., en: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., pp. 17.13A.1-17.13A.26.
43. Garcés-Suárez, Y. (2017). Segmentación de centros de replicación viral en imágenes de Fluorescencia (Tesis de doctorado). Instituto de investigación en ciencias básicas y aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
44. García-Mata, R., Sztul, E. (2003). The membrane-tethering protein p115 interacts with GBF1, an ARF guanine-nucleotide-exchange factor. *EMBO Rep.*, 4(3), 320–325.
45. García-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C., Sztul, E. (2003). ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol. Biol. Cell*, 14(6), 2250–2261.
46. Glass, R.I. (2006). New hope for defeating rotavirus. *Sci. Am.*, 294(4), 46-51.
47. Goedhart, J., Von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., Van Weeren, L., Gadella, T.W.J., Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.*, 3, 751.
48. Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, 95(2), 237–248.
49. Goldstein, I.J., Poretz, R.D. (1986). Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins, en: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (Eds.), *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press Inc., pp. 33–244.
50. González, R.A., Espinosa, R., Romero, P., López, S., Arias, C.F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.*, 145(9), 1963–1973.
51. Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., Rouille, Y. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.*, 84(2), 773–787.

52. Green, V.A., Pelkmans, L. (2016). A systems survey of progressive host-cell reorganization during rotavirus infection. *Cell Host Microbe*, 20(1), 107–120.
53. Grove, J. (2014). Super-resolution microscopy: A virus eye view of the cell. *Viruses.*, 6(3), 1365-1378.
54. Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J.S., Vale, R.D., Walter, P., Farese, R. V. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*, 453(7195), 657–661.
55. Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, 84(18), 9161–9169.
56. Hafirassou, M.L., Meertens, L., Umaña-Díaz, C., Labeau, A., Dejarnac, O., Bonnet-Madin, L., Kümmerer, B.M., Delaugerre, C., Roingear, P., Vidalain, P., Amara, A. (2017). A Global interactome map of the dengue virus NS1 identifies virus restriction and dependency host factors. *Cell Rep.*, 21(13), 3900–3913.
57. Harrison, E.H., Bernard, D.W., Scholm, P., Quinn, D.M., Rothblat, G.H., Glick, J.M. (1990). Inhibitors of neutral cholesteryl ester hydrolase. *J. Lipid Res.*, 31(12), 2187–2193.
58. Heilemann, M., Van De Linde, S., Mukherjee, A., Sauer, M. (2009). Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew. Chem Int. Ed. Engl.*, 48(37), 6903–6908.
59. Hsu, N.Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C.E., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F.J.M., Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, 141(5), 799–811.
60. Hsu, V.W., Yang, J.-S. (2009). Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett.*, 583(23), 3758–3763.
61. Iglesias, N.G., Mondotte, J.A., Byk, L.A., De Maio, F.A., Samsa, M.M., Álvarez, C., Gamarnik, A. V. (2015). Dengue virus uses a non-canonical function of the host GBF1-Arf-COPI system for capsid protein accumulation on lipid droplets. *Traffic*, 16(9), 962–977.

62. Jiang, L., Kosenko, A., Yu, C., Huang, L., Li, X., Hoshi, N. (2015). Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor induces surface transport of KCNQ channels through a CRMP-2-mediated pathway. *J. Cell Sci.*, 128(22), 4235–4245.
63. Kabcenell, A.K., Atkinson, P.H. (1985). Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J. Cell Biol.*, 101(4), 1270–1280.
64. Kaczmarek, B., Verbavatz, J.M., Jackson, C.L. (2017). GBF1 and Arf1 function in vesicular trafficking, lipid homeostasis and organelle dynamics. *Biol. Cell.*, 109(12), 391-399.
65. Kahn, R.A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R.C., Munro, S., Schurmann, A. (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *J. Cell Biol.*, 172(5), 645–650.
66. Kanai, Y., Komoto, S., Kawagishi, T., Nouda, R., Nagasawa, N., Onishi, M., Matsuura, Y., Taniguchi, K., Kobayashi, T. (2017). Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114(9), 2349–2354.
67. Keating, J.A., Striker, R. (2012). Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Rev. Med. Virol.*, 22(3), 166-81.
68. Kim, Y., Chang, K.O., Kim, W.Y., Saif, L.J. (2002). Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology*, 302(1), 1–8.
69. Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(3), 187–198.
70. Knoops, K., Swett-Tapia, C., van den Worm, S.H.E., te Velhuis, A.J.W., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J., Kikkert, M. (2010). Integrity of the early secretory pathway promotes, but is not required for, severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA synthesis and virus-induced remodeling of endoplasmic reticulum membranes. *J. Virol.* 84(2), 833–846.
71. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

72. Lanke, K.H.W., van der Schaar, H.M., Belov, G.A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C.L., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F.J.M. (2009). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J. Virol.*, 83(22), 11940–11949.
73. Liang, W., Zheng, M., Bao, C., Zhang, Y. (2017). CSFV proliferation is associated with GBF1 and Rab2. *J. Biosci.*, 42(1), 43–56.
74. López, T., Camacho, M., Zayas, M., Najera, R., Sánchez, R., Arias, C.F., López, S. (2005). Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79(1), 184–192.
75. Lowery, J., Szul, T., Seetharaman, J., Jian, X., Su, M., Forouhar, F., Xiao, R., Acton, T.B., Montelione, G.T., Lin, H., Wright, J.W., Lee, E., Holloway, Z.G., Randazzo, P.A., Tong, L., Sztul, E. (2011). Novel C-terminal motif within Sec7 domain of guanine nucleotide exchange factors regulates ADP-ribosylation factor (Arf) binding and activation. *J. Biol. Chem.*, 286(42), 36898–36906.
76. Maass, D., Atkinson, P. H. (1990). Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol.*, 64(6), 2632–2641.
77. Maass, D.R., Atkinson, P.H. (1994). Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues. *J. Virol.*, 68(1), 366-378.
78. Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Westaway, E.G. (1999). Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* 73(11), 9555–9567.
79. Mansour, S.J., Herbrick, J.A., Scherer, S.W., Melançon, P. (1998). Human GBF1 is a ubiquitously expressed gene of the sec7 domain family mapping to 10q24. *Genomics*, 54(2), 323–327.
80. Martínez Guevara, J.L. (2015). Análisis de la función del complejo proteico COPI en el ciclo de replicación de rotavirus (Tesis de Maestría). Instituto de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
81. Martínez, J.L., Arias, C.F. (2020). Role of the guanine nucleotide exchange factor GBF1 in the replication of RNA viruses. *Viruses*, 12 (682). (ver Anexo III).
82. Maruri-Avidal, L., López, S., Arias, C.F. (2008). Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J. Virol.*, 82(11), 5368–5380.

83. Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P.C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.*, 156(8), 1397–1413.
84. McLauchlan, J. (2009). Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791(6), 552–559.
85. Meissner, J.M., Bhatt, J.M., Lee, E., Styers, M.L., Ivanova, A.A., Kahn, R.A., Sztul, E. (2018). The ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 is targeted to Golgi membranes through a PIP-binding domain. *J. Cell Sci.*, 131(3), jcs210245.
86. Meissner, J.M., Bhatt, J.M., Newman, L., Kahn, R., Sztul, E. (2016). The C-terminal HDS3 domain of the Sec7 Guanine nucleotide exchange factor GBF1 regulates its membrane recruitment. Trabajo presentado en Septiembre en el congreso FASEB Science Research Conference: “GTPases in Trafficking, Autophagy, and Disease”, West Palm Beach, Florida, USA.
87. Mirazimi, A., Svensson, L. (2000). ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J. Virol.*, 74(17), 8048–8052.
88. Mirazimi, A., Von Bonsdorff, C.H., Svensson, L. (1996). Effect of Brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology*, 217(2), 554–563.
89. Misselwitz, B., Dilling, S., Vonaesch, P., Sacher, R., Snijder, B., Schlumberger, M., Rout, S., Stark, M., von Mering, C., Pelkmans, L., Hardt, W. D. (2014). RNAi screen of *Salmonella* invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and Cdc42. *Mol. Syst. Biol.*, 7, 474–474.
90. Molina, S., Sanz, M.A., Madan, V., Ventoso, I., Castelló, A., Carrasco, L. (2007). Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A. *Virology*, 363(2), 430–436.
91. Monetta, P., Slavin, I., Romero, N., Alvarez, C. (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both Arf1 dynamics and COPI association. *Mol. Biol. Cell*, 18(7), 2400–2410.

92. Mossessova, E., Corpina, R.A., Goldberg, J. (2003). Crystal structure of Arf1*Sec7 complexed with brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol. Cell*, 12(6), 1403–1411.
93. Müller, B., Heilemann, M. (2013). Shedding new light on viruses: Super-resolution microscopy for studying human immunodeficiency virus. *Trends Microbiol.*, 21(10), 522-533
94. Nishi, H., Hashimoto, K., Panchenko, A.R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: Effect on stability and function. *Structure*, 19(12), 1807–1815.
95. Niu, T., Pfeifer, A.C., Lippincott-schwartz, J., Jackson, C.L. (2005). Dynamics of GBF1, a brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell.*, 16(3), 1213–1222.
96. Panda, D., Das, A., Dinh, P.X., Subramaniam, S., Nayak, D., Barrows, N.J., Pearson, J.L., Thompson, J., Kelly, D.L., Ladunga, I., Pattnaik, A.K. (2011). RNAi screening reveals requirement for host cell secretory pathway in infection by diverse families of negative-strand RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(47), 19036–19041.
97. Parker, R.A., Kariya, T., Grisar, J.M., Petrow, V. (1977). 5-(Tetradecyloxy)-2-furancarboxylic Acid and Related Hypolipidemic Fatty Acid-Like Alkyloxyarylcboxylic Acids. *J. Med. Chem.*, 20(6), 781–791.
98. Patton, J.T., Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vásquez-Del Carpio, R., Taraporewala, Z.F. (2006a). Rotavirus genome replication and morphogenesis: Role of the viroplasm. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 309, 169-187.
99. Patton, J.T., Vásquez-Del Carpio, R., Tortorici, M.A., Taraporewala, Z.F. (2006b). Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv. Virus Res.*, 69, 167–201.
100. Pérez, C.A., Eichwald, C., Burrone, O., Mendoza, D. (2005). Rotavirus VP7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice. *J. Appl. Microbiol.*, 99(5), 1158–1164.
101. Petrie, B.L., Estes, M.K., Graham, D.Y. (1983). Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J. Virol.*, 46(1), 270–274.
102. Petrie, B.L., Graham, D.Y., Estes, M.K. (1981). Identification of rotavirus particle types. *Intervirology*, 16(1), 20–28.

103. Pokrovskaya, I.D., Szwedlo, J.W., Goodwin, A., Lupashina, T. V., Nagarajan, U.M., Lupashin, V. V. (2012). *Chlamydia trachomatis* hijacks intra-Golgi COG complex-dependent vesicle trafficking pathway. *Cell. Microbiol.*, 14(5), 656–668.
104. Pol, A., Gross, S.P., Parton, R.G. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol.*, 204(5), 635–646.
105. Poncet, D., Lindenbaum, P., L’Haridon, R., Cohen, J. (1997). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J. Virol.* 71(1), 34–41.
106. Popoff, V., Adolf, F., Brugger, B., Wieland, F. (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3(11), a005231–a005231.
107. Poruchynsky, M.S., Atkinson, P.H. (1991). Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.*, 65(9), 4720–4727.
108. Powell, K.F.H., Gunn, P.R., Bellamy, A.R. (1988). Nucleotide sequence of bovine rotavirus genomic segment 10: an RNA encoding the viral non-structural glycoprotein. *Nucleic Acids Res.*, 16(2), 763–763.
109. Qin, Y., Lin, L., Chen, Y., Wu, S., Si, X., Wu, H., Zhai, X., Wang, Y., Tong, L., Pan, B., Zhong, X., Wang, T., Zhao, W., Zhong, Z., 2014. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 *in vitro*. *Acta Pharm. Sin. B.*, 4(4), 284–294.
110. Ramaen, O., Joubert, A., Simister, P., Belgareh-Touzé, N., Olivares-Sanchez, M.C., Zeeh, J.-C., Chantalat, S., Golinelli-Cohen, M.-P., Jackson, C.L., Biou, V., Cherfils, J. (2007). Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J. Biol. Chem.*, 282(39), 28834–28842.
111. Rambold, A.S., Cohen, S., Lippincott-Schwartz, J. (2015). Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell*, 32(6), 678–692.
112. Ruiz, M.C., Charpilienne, A., Liprandi, F., Gajardo, R., Michelangeli, F., Cohen, J., 1996. The Concentration of Ca²⁺ That Solubilizes Outer Capsid Proteins from Rotavirus Particles Is Dependent on the Strain 70, 4877–4883.

113. Ruiz, M.C., Díaz, Y., Peña, F., Aristimuño, O.C., Chemello, M.E., Michelangeli, F. (2005). Ca²⁺ permeability of the plasma membrane induced by rotavirus infection in cultured cells is inhibited by tunicamycin and brefeldin A. *Virology*, 333(1), 54–65.
114. Sáenz, J.B., Sun, W.J., Chang, J.W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N.S., Haslam, D.B. (2009). Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat. Chem. Biol.*, 5(3), 157–165.
115. Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., Gamarnik, A. V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.*, 5(10), e1000632.
116. Sandoval-Jaime, C., Green, K.Y., Sosnovtsev, S. V. (2015). Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *J. Virol. Methods*, 217, 1–7.
117. Schmid, B., Rippmann, J.F., Tadayyon, M., Hamilton, B.S. (2005). Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328(4), 1073–1082.
118. Shahrabadi, M., Babiuk, L., Lee, P. (1987). Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology*, 158(1), 103–111.
119. Shahrabadi, M., Lee, P. (1986). Bovine rotavirus maturation is a calcium-dependent process. *Virology*, 152(2), 298–307.
120. Shaw, R.D., Vo, P.T., Offit, P.A., Coulsont, B.S., Greenberg, H.B. (1986). Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology*, 155(2), 434–451.
121. Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S., Arias, C.F., 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(25), 10270–10275.
122. Soler, C., Musalem, C., Loroño, M., Espejo, R.T. (1982). Association of viral particles and viral proteins with membranes in SA11-infected cells. *J. Virol.*, 44(3), 983–992.
123. Stirzaker, S., Poncet, D., Both, G. (1990). Sequences in rotavirus glycoprotein VP7 that mediate delayed translocation and retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 111(4), 1343–1350.

124. Stirzaker, S.C., Whitfeld, P.L., Christie, D.L., Bellamy, A.R., Both, G.W. (1987). Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 105(6 Pt 2), 2897–903.
125. Sun, E., He, J., Zhuang, X. (2013). Dissecting the role of COPI complexes in influenza virus infection. *J. Virol.* 87(5), 2673–2685.
126. Suzuki, H., Konno, T., Numazaki, Y. (1993). Electron microscopic evidence for budding process-independent assembly of double-shelled rotavirus particles during passage through endoplasmic reticulum membranes. *J. Gen. Virol.*, 74(Pt 9), 2015–2018.
127. Svensson, L., Dormitzer, P.R., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Greenberg, H.B. (1994). Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J. Virol.* 68(8), 5204–5215.
128. Szul, T., García-Mata, R., Brandon, E., Shestopal, S., Álvarez, C., Sztul, E. (2005). Dissection of membrane dynamics of the Arf-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic*, 6(5), 374–385.
129. Tai, A.W., Benita, Y., Peng, L.F., Kim, S.S., Sakamoto, N., Xavier, R.J., Chung, R.T. (2009). A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe*, 5(3), 298–307.
130. Taylor, J.A., O'Brien, J.A., Yeager, M. (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J.*, 15(17), 4469–4476.
131. Trask, S.D., Dormitzer, P.R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J. Virol.* 80(22), 11293–11304.
132. Trejo-Cerro, Ó., Eichwald, C., Schraner, E.M., Silva-Ayala, D., López, S., Arias, C.F. (2018). Actin-dependent non-lytic rotavirus exit and infectious virus morphogenetic pathway in non-polarized cells. *J. Virol.* 92(6), e02076-17.
133. Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P.C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R.C., Fullman, N., Thompson, R.L., Abajobir, A., Ahmed, M., Alemayohu, M.A., Alvis-Guzman, N., Amare, A.T., Antonio, C.A., Asayesh, H., Avokpaho, E., Awasthi, A., Bacha, U., Barac, A., Betsue, B.D., Beyene, A.S., Boneya, D.J., Malta, D.C., Dandona, L., Dandona, R., Dubey, M., Eshrati, B., Fitchett, J.R.A., Gebrehiwot, T.T., Hailu, G.B., Horino, M., Hotez, P.J., Jibat, T., Jonas, J.B., Kasaeian, A., Kissepp, N., Kotloff, K., Koyanagi, A.,

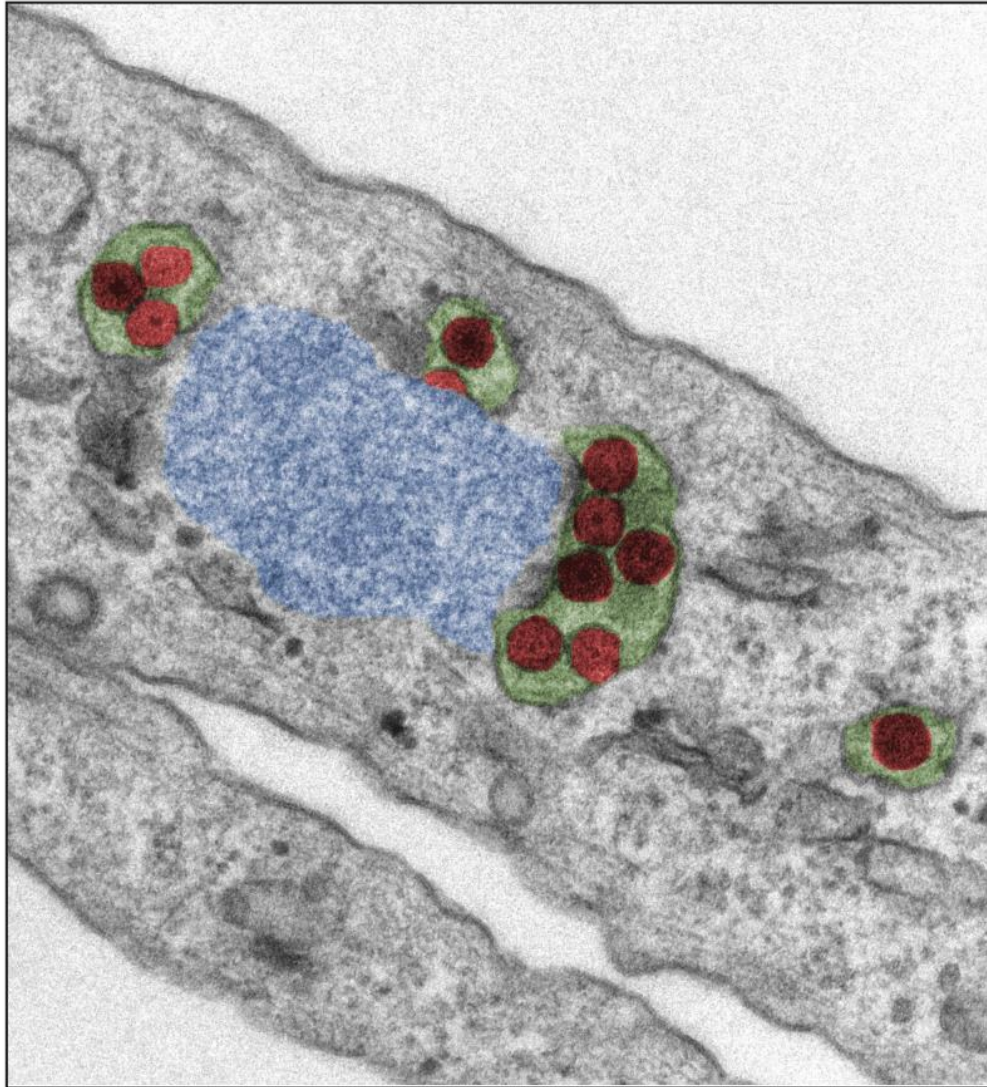
- Kumar, G.A., Rai, R.K., Lal, A., El Razek, H.M.A., Mengistie, M.A., Moe, C., Patton, G., Platts-Mills, J.A., Qorbani, M., Ram, U., Roba, H.S., Sanabria, J., Sartorius, B., Sawhney, M., Shigematsu, M., Sreeramareddy, C., Swaminathan, S., Tedla, B.A., Jagiellonian, R.T.M., Ukwaja, K., Werdecker, A., Widdowson, M.A., Yonemoto, N., El Sayed Zaki, M., Lim, S.S., Naghavi, M., Vos, T., Hay, S.I., Murray, C.J.L., Mokdad, A.H. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.*, 17(9), 909–948.
134. van der Linden, L., van der Schaar, H.M., Lanke, K.H.W., Neyts, J., van Kuppeveld, F.J.M. (2010). Differential effects of the putative GBF1 inhibitors golgicide A and AG1478 on enterovirus replication. *J. Virol.*, 84(15), 7535–7542.
135. Verheije, M.H., Raaben, M., Mari, M., Te Lintelo, E.G., Reggiori, F., van Kuppeveld, F.J.M., Rottier, P.J.M., de Haan, C.A.M. (2008). Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated Arf1 activation. *PLoS Pathog.*, 4(6), e1000088.
136. Volpicelli-Daley, L.A., Li, Y., Zhang, C.-J., Kahn, R.A. (2005). Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1–5 on membrane traffic. *Mol. Biol. Cell*, 16(10), 4495–4508.
137. Vonderstein, K., Nilsson, E., Hubel, P., Skalman, L.N., Upadhyay, A., Pasto, J., Pichlmair, A., Lundmark, R., Överby, A.K. (2018). Viperin targets flavivirus virulence by inducing assembly of noninfectious capsid particles. *J. Virol.*, 92(1), e01751-17.
138. Walther, T.C., Farese, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 81, 687–714.
139. Wang, J., Du, J., Jin, Q. (2014). Class I ADP-ribosylation factors are involved in enterovirus 71 replication. *PLoS One*, 9(6), e99768.
140. Watanabe, T., Kawakami, E., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J.S., Matsuoka, Y., Tomita, Y., Kozuka-Hata, H., Gorai, T., Kuwahara, T., Takeda, E., Nagata, A., Takano, R., Kiso, M., Yamashita, M., Sakai-Tagawa, Y., Katsura, H., Nonaka, N., Fujii, H., Fujii, K., Sugita, Y., Noda, T., Goto, H., Fukuyama, S., Watanabe, S., Neumann, G., Oyama, M., Kitano, H., Kawaoka, Y. (2014). Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe*, 16(6), 795–805.

141. Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K.H.W., Melchers, W.J.G., Jackson, C.L., van Kuppeveld, F.J.M. (2007). Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J. Virol.*, 81(10), 5238–5245.
142. Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K.H.W., van Dooren, S.H.J., Jackson, C.L., Melchers, W.J.G., van Kuppeveld, F.J.M. (2006a). Effects of picornavirus 3A proteins on protein transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.*, 80(23), 11852–11860.
143. Wessels, E., Duijsings, D., Niu, T.K., Neumann, S., Oorschot, V.M., de Lange, F., Lanke, K.H.W., Klumperman, J., Henke, A., Jackson, C.L., Melchers, W.J.G., van Kuppeveld, F.J.M. (2006b). A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev. Cell*, 11(2), 191–201.
144. Wilfling, F., Thiam, A.R., Olarte, M.-J., Wang, J., Beck, R., Gould, T.J., Allgeyer, E.S., Pincet, F., Bewersdorf, J., Farese, R. V, Walther, T.C. (2014). Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife*, 3, e01607.
145. Yadav, V., Panganiban, A.T., Honer Zu Bentrup, K., Voss, T.G. (2016). Influenza infection modulates vesicular trafficking and induces Golgi complex disruption. *Virusdisease.*, 27(4), 357–368.
146. Yeager, M., Dryden, K.A., Olson, N.H., Greenberg, H.B., Baker, T.S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.*, 110(6), 2133–44.
147. Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Cohen, J., Estes, M.K., Ramig, R.F. (1996). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J. Virol.*, 70(5), 2736–2742.
148. Zhang, L., Hong, Z., Lin, W., Shao, R.X., Goto, K., Hsu, V.W., Chung, R.T., 2012. ARF1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication. *PLoS One*, 7 (2), e32135.
149. Zhang, N., Zhang, L. (2017). Key components of COPI and COPII machineries are required for chikungunya virus replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 493(3), 1190–1196.

ANEXO I

Artículo publicado en “Journal of Virology”

The Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1 Participates in Rotavirus Replication



Published _____
Twice Monthly _____
by the _____
American _____
Society _____
for _____
Microbiology _____

Journal of Virology



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

JVI

OCTOBER 2019, VOLUME 93, NUMBER 20



The Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1 Participates in Rotavirus Replication

José L. Martínez,^a Francesca Arnoldi,^{b,c} Elisabeth M. Schraner,^d Catherine Eichwald,^d Daniela Silva-Ayala,^{a*} Eunjoo Lee,^e Elizabeth Sztul,^e Óscar R. Burrone,^b Susana López,^a Carlos F. Arias^a

^aInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

^bInternational Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy

^cDepartment of Medicine, Surgery and Health Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy

^dInstitute of Virology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

^eDepartment of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA

ABSTRACT Cellular and viral factors participate in the replication cycle of rotavirus. We report that the guanine nucleotide exchange factor GBF1, which activates the small GTPase Arf1 to induce COPI transport processes, is required for rotavirus replication since knocking down GBF1 expression by RNA interference or inhibiting its activity by treatment with brefeldin A (BFA) or Golgicide A (GCA) significantly reduces the yield of infectious viral progeny. This reduction in virus yield was related to a block in virus assembly, since in the presence of either BFA or GCA, the assembly of infectious mature triple-layered virions was significantly prevented and only double-layered particles were detected. We report that the catalytic activity of GBF1, but not the activation of Arf1, is essential for the assembly of the outer capsid of rotavirus. We show that both BFA and GCA, as well as interfering with the synthesis of GBF1, alter the electrophoretic mobility of glycoproteins VP7 and NSP4 and block the trimerization of the virus surface protein VP7, a step required for its incorporation into virus particles. Although a posttranslational modification of VP7 (other than glycosylation) could be related to the lack of trimerization, we found that NSP4 might also be involved in this process, since knocking down its expression reduces VP7 trimerization. In support, recombinant VP7 protein overexpressed in transfected cells formed trimers only when cotransfected with NSP4.

IMPORTANCE Rotavirus, a member of the family *Reoviridae*, is the major cause of severe diarrhea in children and young animals worldwide. Despite significant advances in the characterization of the biology of this virus, the mechanisms involved in morphogenesis of the virus particle are still poorly understood. In this work, we show that the guanine nucleotide exchange factor GBF1, relevant for COPI/Arf1-mediated cellular vesicular transport, participates in the replication cycle of the virus, influencing the correct processing of viral glycoproteins VP7 and NSP4 and the assembly of the virus surface proteins VP7 and VP4.

KEYWORDS GBF1 nucleotide exchange factor, morphogenesis, rotavirus

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are nonenveloped particles formed by three concentric layers of proteins that surround the 11 genome segments of double-stranded RNA (dsRNA). The innermost layer is composed of the core shell protein VP2, which encloses the replication intermediates, composed of the RNA-dependent RNA polymerase VP1 and the guanylyl-methyl transferase VP3. The intermediate layer is formed by VP6, which surrounds the VP2 layer to form double-layered particles (DLPs). Finally, the addition of the glycoprotein VP7 and the spike protein VP4 onto the DLPs forms the infectious triple-layered particles (TLPs) (1, 2).

Citation Martínez JL, Arnoldi F, Schraner EM, Eichwald C, Silva-Ayala D, Lee E, Sztul E, Burrone ÓR, López S, Arias CF. 2019. The guanine nucleotide exchange factor GBF1 participates in rotavirus replication. *J Virol* 93:e01062-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01062-19>.

Editor Rozanne M. Sandri-Goldin, University of California, Irvine

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Carlos F. Arias, arias@ibt.unam.mx.

* Present address: Daniela Silva-Ayala, Center for Virology and Vaccine Research, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Received 24 June 2019

Accepted 1 July 2019

Accepted manuscript posted online 3 July 2019

Published 12 September 2019

The replication of rotavirus occurs in cytoplasmic nonmembranous electron-dense inclusions termed viroplasm, composed of NSP2, NSP5, VP1, VP2, VP6, and host components (1, 3). The replication and packaging of the viral genome into newly synthesized DLPs take place in these inclusions (4), which then bud into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) through membrane sites modified by the presence of NSP4 (5, 6). NSP4 is a transmembrane ER glycoprotein with two N-linked high-mannose glycosylated chains (7) that play a crucial role in the last steps of rotavirus assembly. It has been shown that the cytoplasm-oriented terminus of NSP4 associates with VP4 (8) and binds the VP6 on DLPs, acting as a receptor for these particles to mediate their budding into the ER (9, 10). Moreover, NSP4 has been shown to also interact with VP7 through its N terminus oriented to the ER lumen (11, 12). It has been proposed that these interactions drive the incorporation of the outer layer proteins into the transitory lipid envelope that DLPs acquire during ER membrane budding; this envelope is removed in the lumen of the ER by an unknown process in which NSP4 is eliminated while VP4 and VP7 are assembled to produce the final infectious TLPs (13, 14). Although the precise mechanism of the final steps of rotavirus assembly is not well understood, it has been found that the VP7 structure forms trimers on the surface of the virion in a calcium-dependent process (15–18).

Due to the high complexity of rotavirus replication, many of the cellular factors and molecular mechanisms involved in this process are poorly characterized. However, it has recently been reported that the coatamer protein I (COPI)/Arf1 machinery is essential for virus replication since knockdown by RNA interference (RNAi) of the expression of some of the proteins that integrate such machinery reduces virus replication (19, 20). Also, brefeldin A (BFA), an inhibitor of the COPI/Arf1-mediated vesicular transport, significantly impairs the rotavirus progeny yield (21). COPI is a protein complex formed by seven subunits (α , β , β' , δ , ϵ , γ , and ζ -COP) that mediates the retrograde transport of vesicles from the Golgi complex to the ER (22–24). Besides its canonical functions in the secretory pathway, the COPI/Arf1 machinery also may participate in the maturation of early endosomes and in recycling proteins to the plasma membrane (25, 26), as well as in the maturation of phagosomes (27, 28) and peroxisomes (29). Furthermore, multiple reports suggest that the COPI/Arf1 machinery is also involved in transport events involved in the maturation and function of lipid droplets (LDs) (30–32).

In the initial step of the COPI transport, the small GTPase Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) is activated with a GTP molecule in a process catalyzed by the guanine nucleotide exchange factor GBF1 (Golgi-specific BFA resistance factor 1) located at the *cis*-Golgi membrane and the intermediate ER-Golgi compartment (ERGIC) (33). The activated Arf1-GTP associates with the Golgi membrane and promotes the recruitment of the preformed COPI complex, as well as of the Arf1-GTPase-activating protein (Arf1GAP). The formation of Arf1/COPI/Arf1GAP complex stimulates the binding and concentration of different cargoes located in the membrane, an association that induces the bending of the membrane into a vesicle. Once completed, the vesicle buds from the membrane covered by the COPI complex proteins. Finally, the coat proteins are disassembled when the GTPase activity of Arf1 is enhanced by Arf1GAP, leading to the hydrolysis of the GTP bound to Arf1. This hydrolysis leads to the release from the membrane of Arf1, COPI, and Arf1GAP (34, 35).

GBF1 belongs to a subfamily of large guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that also includes the mammalian BIG1 and BIG2 located at the *trans*-Golgi network (TGN) (36). These three GEFs activate Arf1; however, GBF1 may also use Arf4 and Arf5 as the substrates (37–39), while BIG1 and BIG2 can catalyze the activation of Arf3, Arf5, and Arf6 (40–42). Arf activation is catalyzed by the Sec7 domain, shared by all GEFs. In addition, GBF1 contains five noncatalytic domains: the N-terminal dimerization and cyclophilin binding (DCB) domain, the homology domain upstream of Sec7 (HUS), and three C-terminal homology domains downstream of Sec7 (HDS1 to -3) (33, 36). The functions of these noncatalytic domains are not well understood, but the N-terminal DCB and HUS domains have been implicated in inter- and intramolecular interactions

important for GBF1 dimerization and its association with membranes (43, 44), while the HDS1 to -3 domains have been suggested to facilitate GBF1 association with membranes (45–48).

In this study, we evaluated the role of the GBF1/COPI/Arf1 machinery in rotavirus replication. We showed that the catalytic activity of GBF1 is critical for virus replication by using two different pharmacological inhibitors, BFA and Golgicide A (GCA), and knocking down GBF1 expression by RNAi. We found that interfering with GBF1 activity significantly impaired the yield of viral progeny through a block in the assembly of the virus surface proteins VP7 and VP4, which prevents the production of mature and infectious TLPs. We also showed that this restriction in the assembly of TLPs is the result of damage in VP7 trimerization required for its assembly into DLPs. We provide evidence suggesting that the altered posttranslational modification of either VP7 or NSP4 in GBF1-inactivated cells is responsible for the defective formation of VP7 trimers. Altogether, our findings suggest that GBF1 activity is essential for rotavirus outer capsid assembly by allowing the correct processing of VP7 and/or NSP4, possibly through a mechanism independent of Arf1.

RESULTS

Inhibition of GBF1 hinders rotavirus replication. Earlier reports have indicated that the COPI/Arf1 machinery is important for rotavirus replication (19, 20), and we characterized the effects of the pharmacological inhibitors BFA and GCA, which block the GBF1-mediated activation of Arf1 required for COPI transport (34, 35, 49, 50), on the replication of rotaviruses. In these assays, MA104 cells were pretreated for 30 min with different concentrations of BFA or GCA before virus infection. The simian rhesus rotavirus (RRV) was then added to cells in the presence of the inhibitors for 1 h at 37°C. Then, the virus inoculum was removed, and fresh media containing the inhibitors were added; 12 h postinfection (hpi), the total virus (from cells and media) was recovered, and the viral yield was determined. We found that treatment with BFA (at a concentration of 0.5 μ g/ml or higher) reduced by more than 100-fold the viral yield (Fig. 1A); this observation is in agreement with a previous report (21).

Similarly, treatment with GCA diminished viral progeny about 50-fold (Fig. 1B). Cell treatment with the inhibitors did not alter cell viability at any of the concentrations tested, as determined by a lactate dehydrogenase (LDH) assay (data not shown). Moreover, the reduction of viral yield was independent of the rotavirus strain tested, since BFA also significantly inhibited the replication of SA11 (simian origin), UK (bovine origin), 69M (human origin), and YM (porcine origin) (Fig. 1C). However, the extent of inhibition differed among the strains: while the replication of SA11 was reduced to a level similar to that of RRV (about 100-fold), that of rotavirus strains UK, 69M, and YM was reduced by about 10-fold.

To determine whether GBF1 was directly involved in virus replication, we transfected MA104 cells with a small interfering RNA (siRNA) to GBF1, which very efficiently knocked down the synthesis of this protein (Fig. 1D, left), and 72 h posttransfection (hpt), cells were infected with RRV. After 12 hpi, the total virus was harvested, and the viral yield was determined. Silencing the expression of GBF1 reduced the yield of viral progeny by about 70% compared to that produced in cells transfected with control, irrelevant siRNA (Fig. 1D, right). These results, together with the fact that GCA decreases RRV replication to a level similar to that observed with BFA, strongly suggest that GBF1 activity might be involved in the replication cycle of rotaviruses.

BFA and GCA inhibit a postentry stage of the virus replication cycle. To evaluate the step of the virus life cycle affected by BFA and GCA, the drugs were added at different times postinfection to cells infected with RRV, as indicated in Fig. 2A, and at 12 hpi, the total virus was recovered, and the viral yield was determined. The addition of the drugs at 0 and 2 hpi decreased the viral yield by more than 90%; the inhibitory effect was less evident at subsequent times postinfection. When added at 4 hpi, the drugs reduced only around 60% of the viral progeny production, and at later times, they showed no significant inhibitory activity (Fig. 2A). The fact that the drugs showed

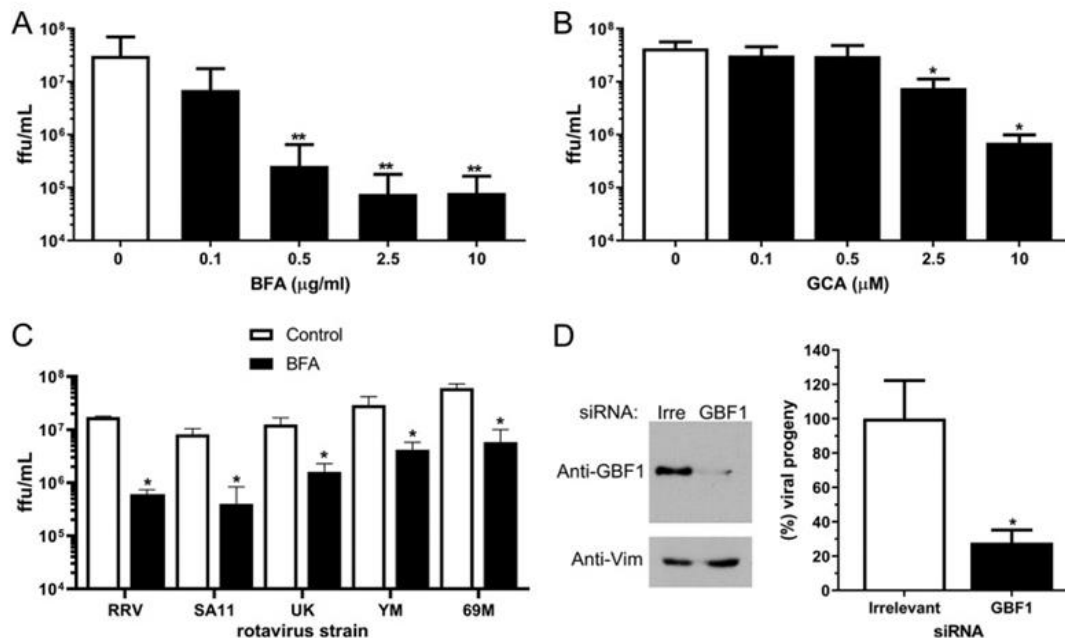


FIG 1 Inhibition of COPI/Arf1 activity reduces the production of viral progeny. MA104 cells were pretreated for 30 min with BFA (A) or GCA (B) at the indicated concentrations. Treated cells were infected with RRV at an MOI of 5 in the presence of the inhibitors for 1 h, the unbound virus was removed, and fresh medium containing the drugs was added. At 12 hpi, the total virus obtained from cells and media was harvested, and the viral titer was determined by an immunoperoxidase assay. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. (C) MA104 cells were infected with the indicated rotavirus strains (MOI = 5) in the presence of BFA (0.5 μ g/ml), and the viral titer (FFU/ml) of the total virus was determined by an immunoperoxidase assay. The arithmetic means \pm standard deviations from two independent experiments performed in duplicate are shown. (D) MA104 cells were transfected with an siRNA to GBF1. (Left panel) Representative Western blot analysis of cells transfected with the indicated siRNA. The expression of GBF1 was detected with a specific antibody. Vimentin (Vim) was used as a loading control. (Right panel) At 72 hpt, cells transfected with either a scrambled siRNA or GBF1 siRNAs were infected with RRV (MOI = 5). At 12 hpi, the total virus from cells and media was collected, and the viral titer was determined. Data represent the percentages of virus progeny, where the cells transfected with an irrelevant siRNA (Irre) correspond to 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.01$.

a similar inhibitory effect when preincubated with cells or when added 2 hpi suggests that the inhibitors are most likely affecting the replication of RRV at a postentry step. These findings are in agreement with the previous observation that the effect of silencing the expression of β -COP on virus replication was not relieved by transfection of RRV double-layered particles into the siRNA-treated cells (19). Of interest, the fact that the effect of the drugs seems to decline when added at 4 hpi, a time when the assembly of virus particles has already started (Fig. 2B), suggests the inhibitors could interfere with the virus assembly process. The similar effects observed for GCA and BFA support the initial observation that the relevant target for the drugs is GBF1.

BFA and GCA block the production of TLPs. To confirm that the decrease in viral yield was related to a defect in virus assembly, MA104 cells were infected with RRV in the presence of the drugs and the assembly of viral particles was analyzed by CsCl density gradients. Under control conditions, two opalescent bands were observed in the gradients (Fig. 3A and C), which were shown to correspond to TLPs and DLPs by PAGE analysis (Fig. 3B and D). In contrast, in cells treated with BFA or GCA, a single major band that migrated at a density similar to that of DLPs was detected and by PAGE was shown to contain particles formed exclusively by proteins VP1, VP2, and VP6 (Fig. 3B). These results indicate that the inhibitors block the assembly of the outermost protein layer, formed by VP4 and VP7, onto the correctly assembled DLPs.

These results were confirmed by negative-staining electron microscopy analysis of drug-treated infected cells. For this, MA104 cells were infected with RRV in the presence of the drugs, and 6 hpi cells were fixed and processed for electron microscopy. In control, untreated cells, typical electron-dense viroplasm structures were observed near

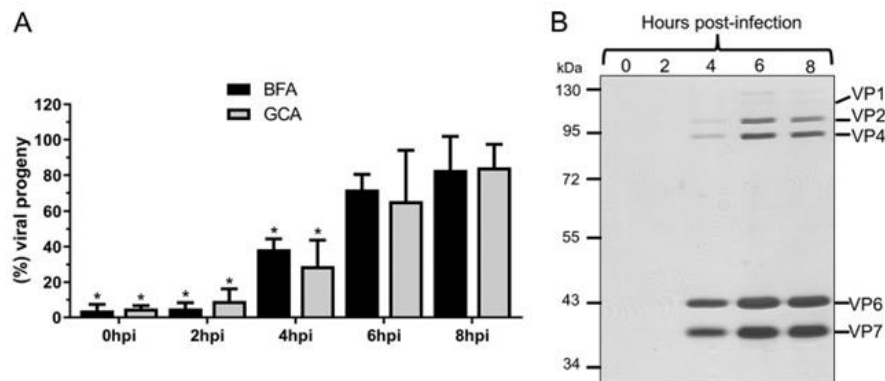


FIG 2 BFA and GCA inhibit rotavirus replication at a postentry step. (A) MA104 cells were infected with RRV (MOI = 5) at 37°C for 1 h. Unbound virus was removed, and 0.5 μg/ml of BFA or 10 μM GCA was added at the indicated times postinfection. At 12 hpi, the total virus obtained from cells and media was recovered, and the viral titer was determined. Cell data represent the percentage of the virus progeny obtained from untreated cells that correspond to 100% infectivity. The arithmetic means ± standard deviations from two independent experiments performed in duplicate are shown. *, *P* < 0.05. (B) Representative gel electrophoresis analysis of RRV particles produced at different times postinfection. MA104 cells were infected with RRV (MOI = 5) in the absence of the inhibitors for 1 h at 37°C. Unbound virus was removed, and fresh medium was added. At the indicated times postinfection, the virus was semipurified as described in Materials and Methods (see “Enrichment of viral particles”). The same proportion of each sample was loaded onto the gel, which was silver stained. The migration pattern of the viral structural proteins is indicated (right).

the ER membrane. Furthermore, viral particles, presumably DLPs, appear to be budding into the lumen of the ER, leading to the formation of membrane-enveloped particles. Many of the viral particles within the ER seem to have lost their lipid envelope and look like mature TLPs (Fig. 4A). We found that neither BFA nor GCA prevented the budding of DLPs into the ER to form membrane-enveloped particles; however, the assembly pathway seems to be arrested at this point since the intermediate enveloped particles accumulated within the ER, and they did not seem to mature to TLPs (Fig. 4B and C). It should be noted that the intermediate membrane-enveloped particles are not detected in the CsCl gradients since they most probably lose their membrane upon trichloromonofluoromethane extraction and are rather detected as DLPs.

The electrophoretic mobility of VP7 and NSP4 is altered during the inhibition of GBF1 activity. Since it has been reported that BFA alters the electrophoretic mobility of VP7 and NSP4 (21), we decided to investigate if the effect of GCA in virus assembly was related to a modification of these viral proteins. MA104 cells were infected with RRV in the presence of the inhibitors as described above, and at 7.5 hpi, the cellular proteins were pulse-labeled with [³⁵S]Met for 30 min and chased for 2 h. As seen in Fig. 5A, the inhibitors did not affect the synthesis of either cellular or viral proteins. However, the viral glycoproteins VP7 and NSP4 had modified electrophoretic mobility in the presence of the drugs. In treated cells, VP7 migrated slower than in control cells, while NSP4 showed faster mobility. This distinct electrophoretic behavior was more clearly observed in drug-treated infected cells labeled with [³H]mannose, conditions in which only the two viral glycoproteins are labeled (Fig. 5B).

To confirm that the alterations in the electrophoretic mobility of VP7 and NSP4 were due to the inhibition of GBF1, MA104 cells were transfected with the siRNA to GBF1 to silence its expression and infected with RRV; at 7.5 hpi, the cells were pulse-labeled with [³⁵S]Met as described above. As observed when the pharmacological inhibitors were used, knocking down the expression of GBF1 also caused changes in the electrophoretic mobility of VP7 and NSP4 (Fig. 5C); in this case, the change was partial, most likely due to incomplete GBF1 knockdown in all cells. To our knowledge, GBF1 is the first identified regulatory cellular factor that affects the mobility of VP7 and NSP4.

Furthermore, we also observed that the modification of the electrophoretic mobility of VP7 and NSP4 was independent of the rotavirus strain, since these changes were also

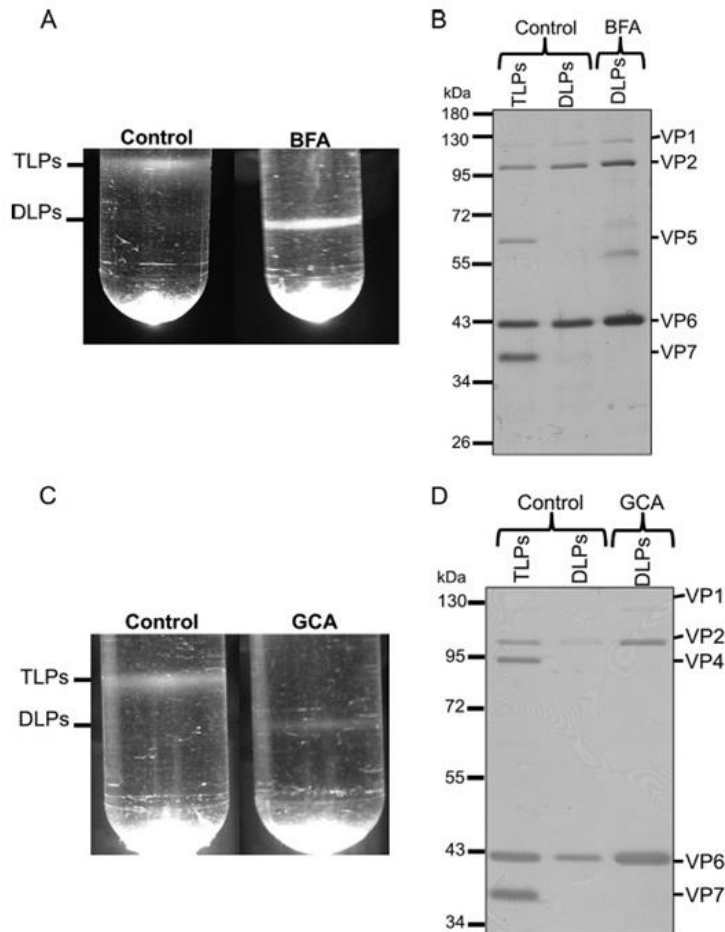


FIG 3 BFA and GCA block the production of TLPs. (A) Isopycnic CsCl gradients of viral particles assembled in the absence or presence of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ BFA (A) or 10 μM GCA (C). (B and D) Gel electrophoresis analysis of the viral proteins in the bands detected in the isopycnic gradients shown in panels A and C. The same proportion of each collected band was loaded onto the gel, which was silver stained. The migration of the viral structural proteins in the gels is indicated (right).

observed for rotavirus strains SA11, UK, 69M, and YM after BFA treatment (data not shown). These results indicate that despite the different amino acid sequences of VP7 and NSP4 among the various rotavirus strains, the lack of GBF1 activity inhibits a common posttranslational processing.

Modification of the electrophoretic mobility of VP7 in the presence of BFA or GCA is not related to changes in the structure of its carbohydrate chain. It has been shown previously that the treatment of rotavirus-infected MA104 cells with BFA reduces the electrophoretic mobility of VP7, and it was proposed that this change could be related to an altered oligosaccharide chain (21). To determine if the abnormal migration of VP7 in the presence of the inhibitors was due to a modification of its carbohydrate moiety, we characterized the effect of the drugs on the migration of the VP7 protein and replication of the mutant strain SA11-CL28, a simian rotavirus SA11 variant that lacks the N-glycosylation site in VP7 and thus is nonglycosylated (51). The absence of glycosylation of this protein was confirmed by metabolically labeling the virus with [^3H]mannose. NSP4, but not VP7 was labeled, as detected by PAGE and fluorography (data not shown).

Similar to that observed with wild-type SA11 (SA11wt), treatment of cells with BFA or GCA decreased yield of mutant SA11-CL28 virus by more than 90% (Fig. 6A). The drug treatments also reduced the electrophoretic mobility of both the glycosylated VP7 of SA11wt and the nonglycosylated VP7 of SA11-CL28 (Fig. 6B), suggesting that the

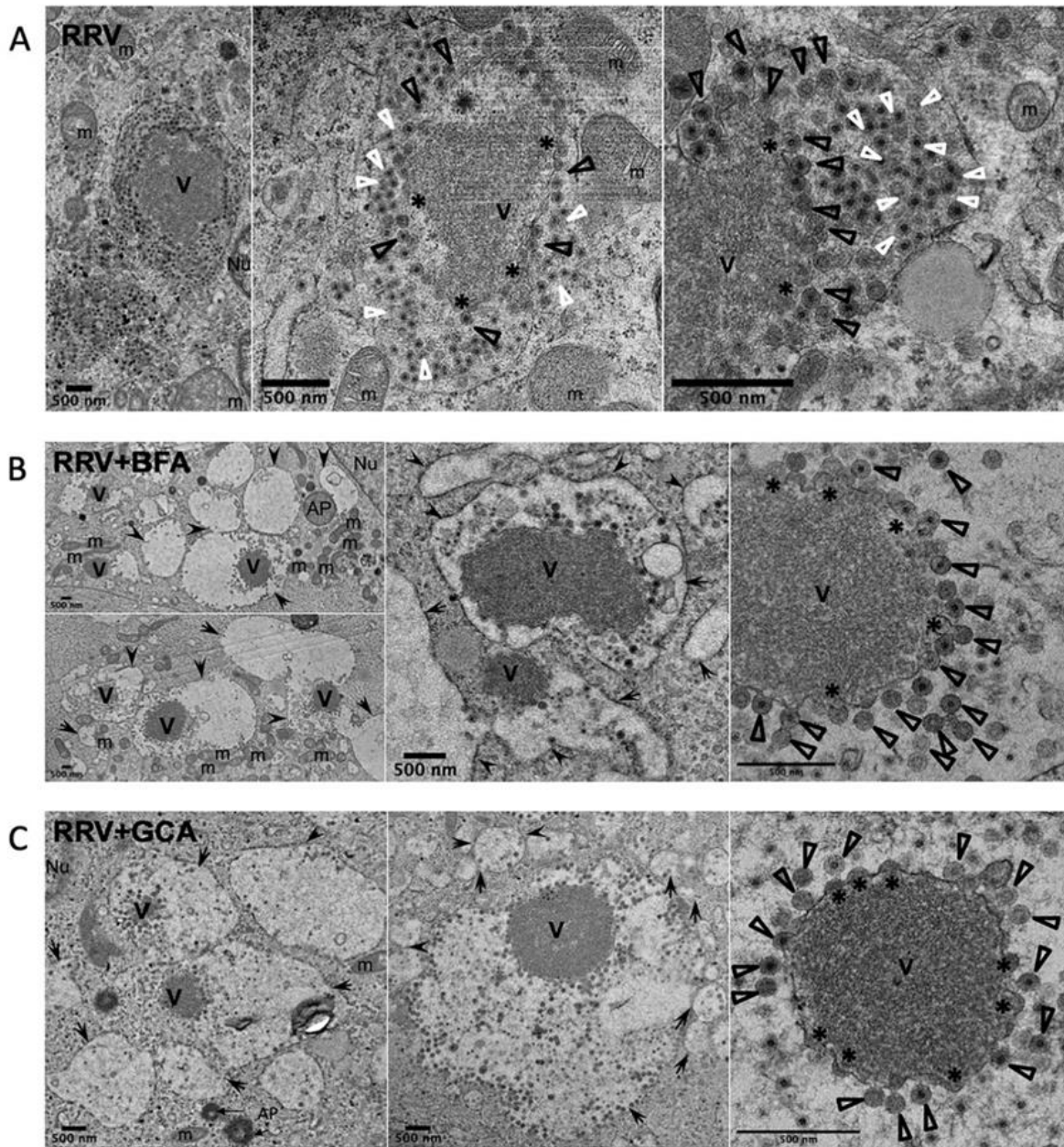


FIG 4 BFA and GCA do not block the budding of rotavirus DLPs into the ER. MA104 cells untreated (A) or treated with 0.5 μ g/ml BFA (B) or 10 μ M GCA (C) were infected with RRV at 250 viroplasm-forming units per cell. At 6 hpi, the cells were fixed and processed for transmission electron microscopy. The black arrowheads indicate the swollen vesicles of the endoplasmic reticulum observed in the presence of BFA or GCA. The open arrowheads and asterisks denote the TLPs' and DLPs' budding sites in viroplasm, respectively. V, viroplasm; Nu, nucleus; m, mitochondrion; AP, autophagosome. The size bar is 500 nm.

change in mobility of VP7 in cells treated with the drugs is not due to a change in glycosylation. Furthermore, by characterizing the electrophoretic mobility of a recombinant RRV VP7 protein overexpressed in MA104 cells, we show that the change observed after BFA treatment is not due to either N- or O-glycosylation or phosphorylation (Fig. 7A to C). In addition, a recombinant RRV VP7 protein with the N-glycosylation site mutated (69-NST-71 to 69-QSG-71) still showed a reduced electrophoretic mobility after treatment with BFA or GCA, confirming the results observed with the mutant SA11-CL28 virus (Fig. 7D).

An inefficient trimerization of VP7 may be responsible for the defective assembly of TLPs. It has been shown that in the absence of VP7, the transiently

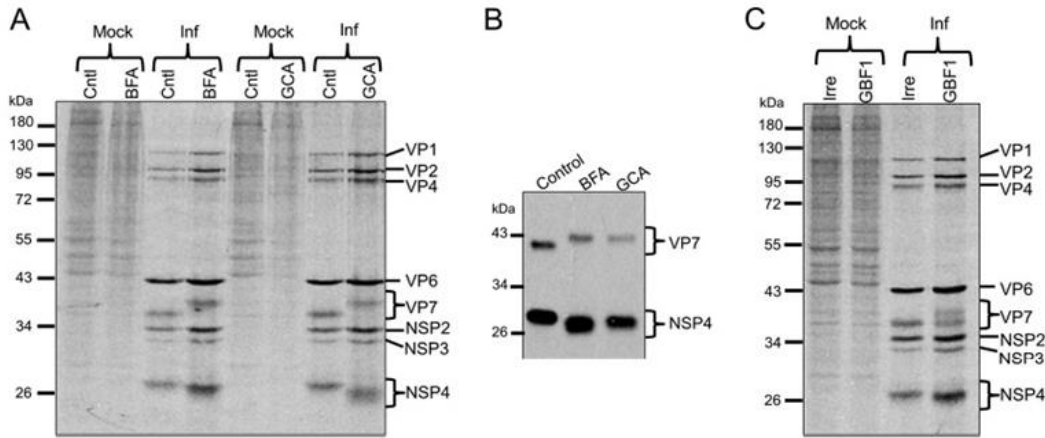


FIG 5 Inhibition of GBF1 activity changes the electrophoretic mobility of VP7 and NSP4. (A) Autoradiography of mock-infected or infected lysates (RRV, MOI = 5) in the presence of BFA (0.5 μ g/ml) or GCA (10 μ M). At 7.5 hpi, the cells were pulse-labeled with 25 μ Ci/ml of [35 S]Met/Cys for 30 min, and then the cells were harvested at 10 hpi. Cntl, control cells. (B) Fluorography of infected lysates in the presence of BFA (0.5 μ g/ml) or GCA (10 μ M). At 6.5 hpi, the cells were radiolabeled with 200 μ Ci/ml of [3 H]mannose for 1.5 h, and then the cells were harvested at 10 hpi. (C) Autoradiography of lysates transfected with the indicated siRNA and mock infected or infected with RRV (MOI = 5). At 7.5 hpi, the cells were pulse-labeled with 25 μ Ci/ml of [35 S]Met/Cys. The migration pattern of the viral structural and nonstructural proteins in the gels is indicated (right). Irre, irrelevant siRNA.

enveloped intermediate particles do not mature to infectious virus (52); it was proposed that after budding into the lumen of the ER, VP7 assembles into the DLPs, excluding the lipid envelope during this process, as well as NSP4, yielding the mature infectious virions (52). Since VP7 exists as trimers in the mature, infectious virus particles (17), we evaluated whether BFA and GCA treatments affected trimerization of the protein. For this, MA104 cells were infected with RRV in the presence of either inhibitor, and 6 hpi the cells were fixed and costained with an antibody to the viral nonstructural protein NSP2, which forms part of the viroplasm, and with monoclonal antibody (MAb) 159 to VP7, which only recognizes the trimeric form of the protein (18, 53).

In rotavirus-infected, untreated cells, the trimeric isoform of VP7 was observed in the cytoplasm of infected cells, surrounding the viroplasm (Fig. 8A). In contrast, in cells

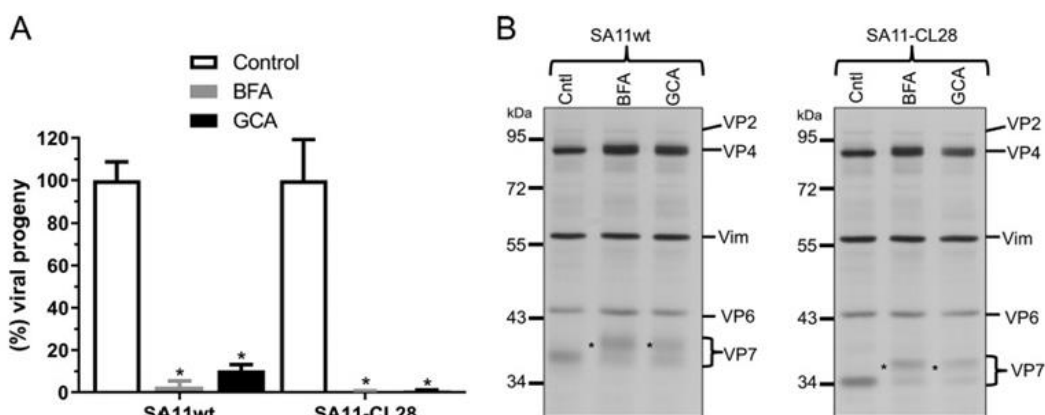


FIG 6 The alteration of the electrophoretic mobility of VP7 in the presence of BFA or GCA is not related to modified glycosylation. (A) MA104 cells were pretreated for 30 min with BFA (0.5 μ g/ml) or GCA (10 μ M) and then infected with wild-type SA11 (SA11wt) or the mutant SA11-CL28 strain, both at an MOI of 5, in the presence of inhibitors for 1 h. Unbound virus was removed, and fresh medium containing BFA or GCA was added. At 12 hpi, the total virus obtained from cells and media was harvested, and the viral titer was determined. Data represent the virus progeny relative to untreated cells. The arithmetic means \pm standard deviations from two independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$. (B) Representative Western blot analysis of proteins from untreated cells (Cntl) or BFA- or GCA-treated cells infected with SA11wt or SA11-CL28 at 8 hpi. Expression of structural viral proteins was detected with an antirotavirus polyclonal serum raised against purified TLPs. Vimentin (Vim) was used as a loading control. The migration pattern of the viral structural proteins in the gels is indicated (right). The asterisks mark the position of the slow-migrating VP7 protein.

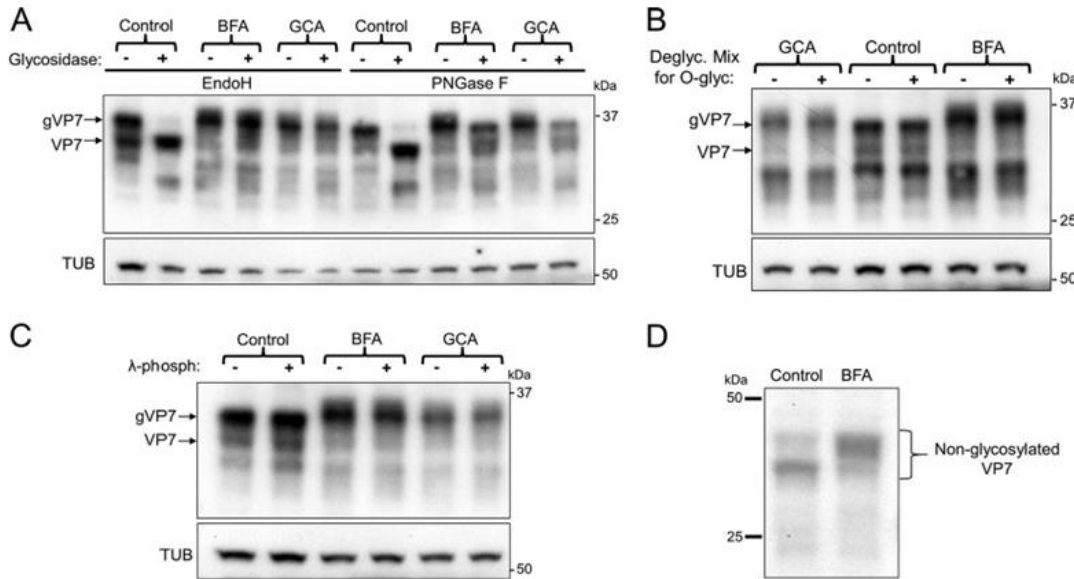


FIG 7 BFA- and GCA-induced modification of VP7 electrophoretic mobility is related to neither N/O-glycosylation nor phosphorylation. MA104 cells were transfected with a plasmid coding for the VP7 protein of RRV and treated with BFA or GCA (5 μg/ml) at 1 hpt. At 18 hpt, the cells were lysed, and the lysate underwent treatment with either of the following enzymes: (A) PNGaseF (peptide-*N*-glycosidase F), which removes almost all types of N-linked (Asn-linked) glycosylation or EndoH (endo-β-*N*-acetylglucosaminidase H), which removes only high-mannose and some hybrid types of N-linked carbohydrates; (B) a protein deglycosylation mixture, which in addition to all N-linked glycans removes many common O-linked glycans; or (C) λ-phosphatase, a protein phosphatase with activity toward phosphorylated serine, threonine, and tyrosine residues. The figure shows a representative Western blot of the cell extracts incubated with the enzymes indicated. Expression of the VP7 protein was detected with a specific antibody. The glycosylated (gVP7) and deglycosylated (VP7) forms of VP7 are indicated. Tubulin (TUB) was used as loading control. (D) Representative Western blot of MA104 cells expressing a recombinant RRV VP7 protein with the N-glycosylation site mutated (69-NST-71 to 69-QSG-71); BFA (2.5 μg/ml) was added at 1 hpt, and the cells were lysed at 18 hpt. The expression of nonglycosylated VP7 was detected with a specific antibody.

treated with BFA or GCA, even though the presence of NSP2 was detected, no signal of the trimeric form of VP7 was observed (Fig. 8A). To verify that the lack of trimers was not due to the absence of VP7, we conducted the same assay but using MAb M60, which primarily recognizes the monomeric, nonvirion-associated form of VP7 (18, 53). In the absence of inhibitors, the monomeric form of VP7 showed a reticular pattern distributed across the cell cytoplasm, with some of the protein surrounding viroplasm (Fig. 8A). Treatment with the inhibitors did not abolish the signal of the VP7 monomers, although the distribution of the protein changed to a punctate pattern (Fig. 8A). Taken together, the treatment with BFA or GCA prevents the formation of VP7 trimers. Of interest, the block in the trimerization of VP7 seems to be independent of alterations in its glycosylation pattern, since BFA also inhibited the trimerization of the VP7 protein of SA11wt and SA11-CL28 viruses without apparently altering the intracellular levels of the monomeric form of the protein (Fig. 8B and C).

We also found that knocking down the expression of GBF1 abolished the trimerization of VP7 (Fig. 9); similar to the experiments with the pharmacological inhibitors, the trimeric form of VP7 (MAb 159) was detected at 6 hpi in the majority of the infected cells transfected with an irrelevant siRNA. In contrast, in cells transfected with the siRNA to GBF1, the trimeric form of VP7 could not be detected, even though the cells were positive for NSP2. However, as described above, the absence of trimers was not due to a deficient synthesis of VP7, since in GBF1-silenced cells the monomeric form of VP7 (detected by MAb M60) was observed in most cells (Fig. 9).

NSP4 is involved in VP7 trimerization. To explore if the lack of trimerization of VP7 could be related to the change in electrophoretic mobility of NSP4, the expression of NSP4 was silenced by RNAi in MA104 cells stably expressing the NSP5 protein fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) (54), and the presence of NSP4 as well as the trimeric or monomeric forms of VP7 was determined in infected cells with specific

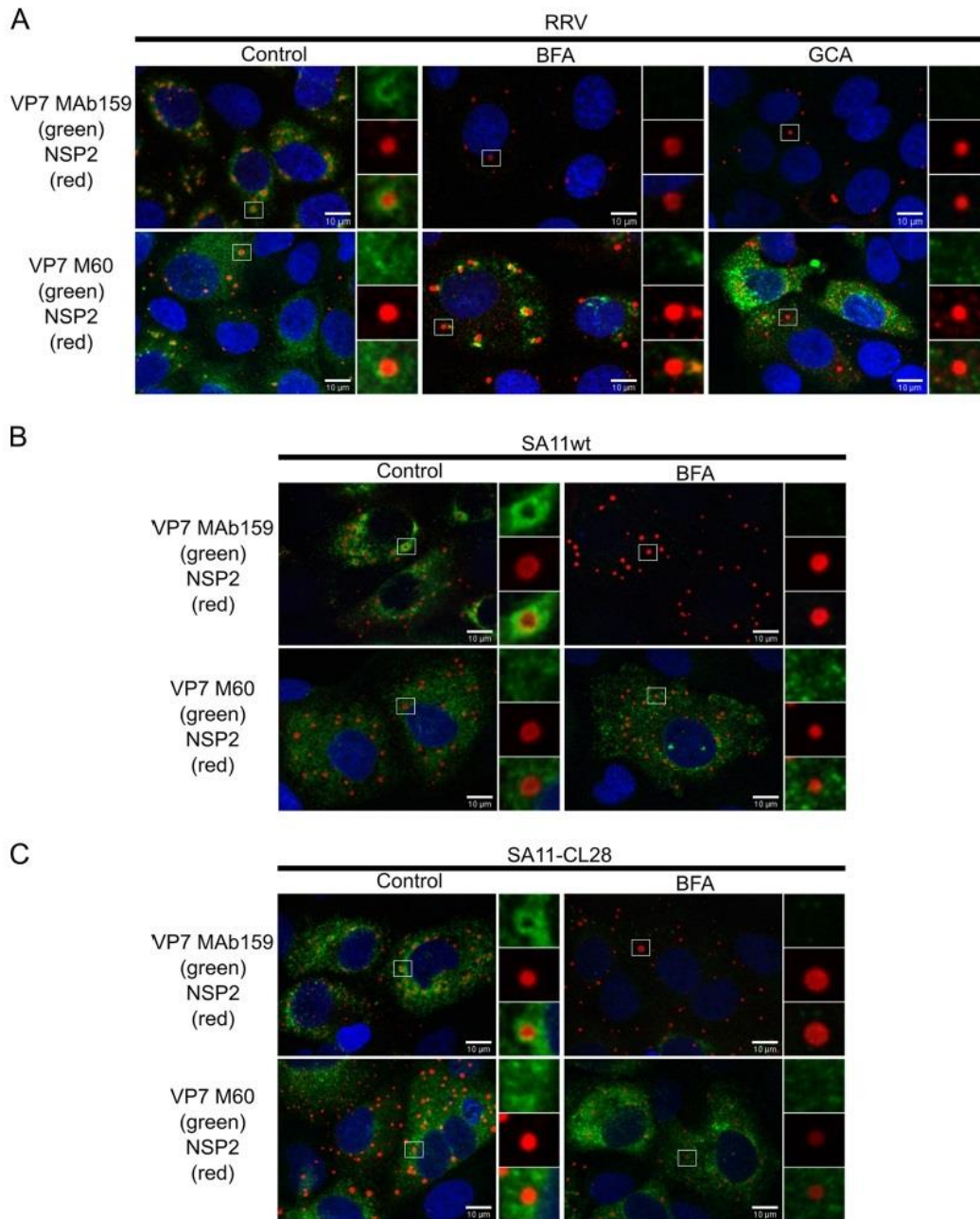


FIG 8 BFA and GCA inhibit the trimerization of the glycosylated and nonglycosylated forms of VP7. Shown is immunofluorescence of MA104 cells infected with RRV (A), SA11wt (B), or SA11-CL28 (C) at an MOI of 1 in the absence or presence of BFA (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or GCA (10 μM). At 6 hpi, the cells were fixed and coimmunostained with antibodies against either NSP2 (red) and VP7 trimers (MAb159, green) (upper row) or NSP2 (red) and VP7 monomers (M60, green) (lower row). The nuclei (blue) were stained with DAPI. The inset box corresponds to amplified images shown to the right of each image. The scale bar is 10 μm .

antibodies. As can be observed in Fig. 10 (upper panels), cells transfected with an irrelevant siRNA contained the trimeric form of VP7, as detected with MAb 159. In contrast, the cells depleted of NSP4 did not show the trimeric form of VP7, even though they were infected, as judged by the presence of the viroplasm labeled with NSP5-EGFP. Similar to the previous experiments, the absence of trimers was not due to a deficient synthesis of VP7, since the monomeric form of VP7 (detected with MAb M60) was observed in NSP4-silenced cells (Fig. 10, lower panels). Moreover, as previously reported (52), knocking down the expression of NSP4 induced a reduction in the size

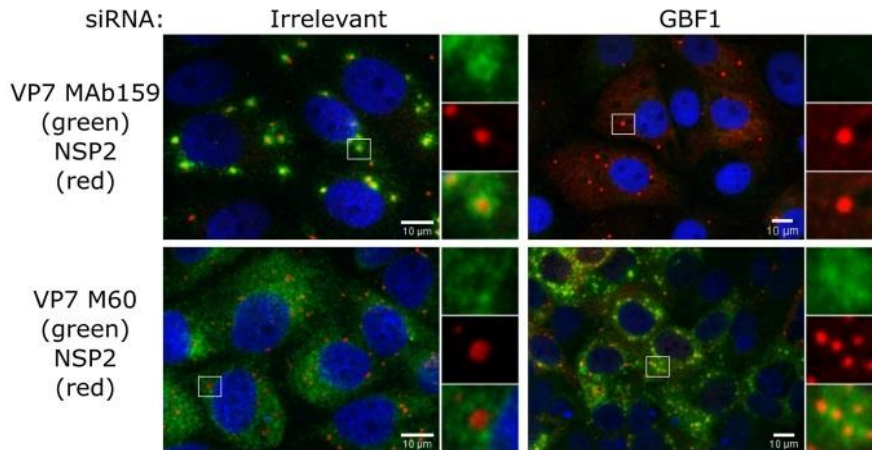


FIG 9 Silencing the expression of GBF1 blocks VP7 trimerization. Shown is immunofluorescence of MA104 cells transfected with the indicated siRNA and at 72 hpt infected with RRV (MOI = 3). At 6 hpi, the cells were fixed and coimmunostained with antibodies against either NSP2 (red) and VP7 trimers (Mab159 [green]) (upper panel) or NSP2 (red) and VP7 monomers (M60 [green]) (lower panel). The cells' nuclei (blue) were stained with DAPI. The inset box corresponds to magnified images shown to the right. The scale bar is 10 µm.

of viroplasm (Fig. 10). This result is consistent with a previous report showing that NSP4 might stimulate the assembly of VP7 (55).

To further explore whether the trimerization of VP7 depends on the presence of NSP4, HEK293 cells expressing constitutively the T7 polymerase (Pol) (56) were cotrans-

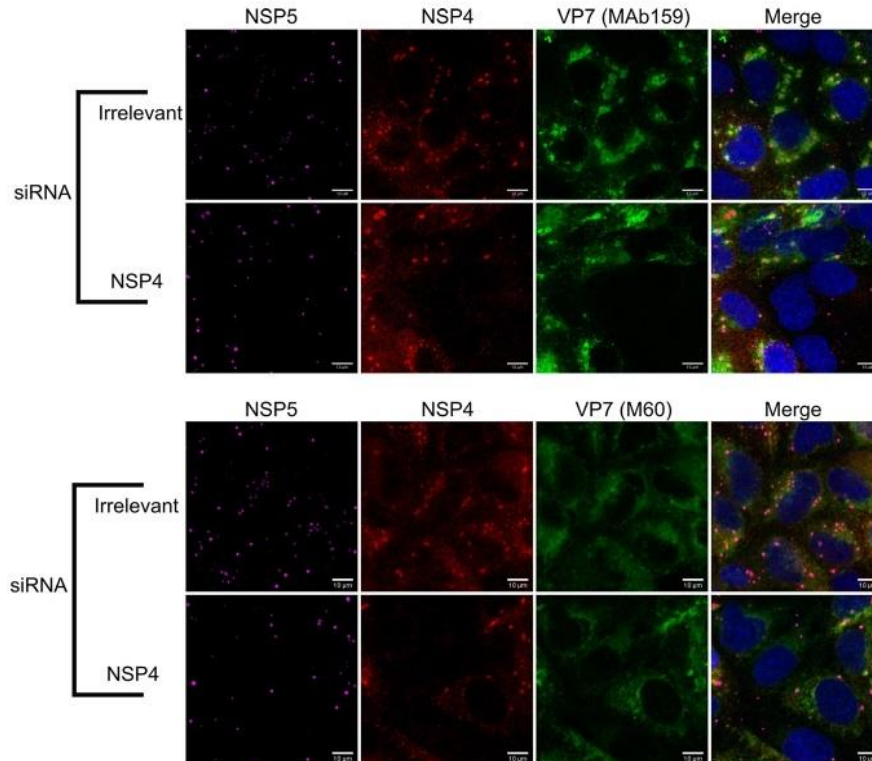


FIG 10 Silencing the expression of NSP4 inhibits the trimerization of VP7. Immunofluorescence of MA104 cells stably expressing NSP5-EFGP (magenta), which were transfected with the indicated siRNA and infected with RRV (MOI = 3) at 72 h posttransfection. At 6 hpi, cells were fixed and coimmunostained with antibodies against either NSP4 (red) and VP7 trimers (Mab 159 [green]) (upper row) or NSP4 (red) and VP7 monomers (M60 [green]) (lower row). Cells' nuclei (blue) were stained with DAPI. The scale bar is 10 µm.

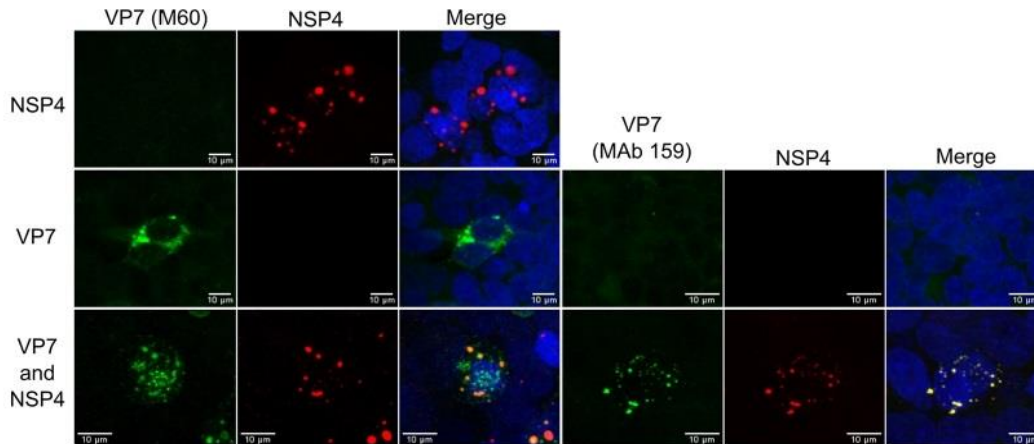


FIG 11 NSP4 facilitates the VP7 trimerization. Immunofluorescence of HEK293-T7 RNA polymerase cells cotransfected with the vaccinia virus capping enzyme expression plasmids (D1R and D12L) and either a plasmid encoding nonglycosylated VP7 or NSP4 or a combination of both plasmids. At 24 hpt, the cells were fixed and coimmunostained with antibodies directed to either NSP4 (red) and VP7 monomers (M60 [green]) or NSP4 (red) and VP7 trimers (MAb159 [green]). The cells' nuclei (blue) were stained with DAPI. The scale bar is 10 μ m.

fectured with plasmids D1R and D12L, encoding the two subunits of the vaccinia virus capping enzyme, which efficiently caps the T7 Pol RNA polymerase transcripts in the cytoplasm (57), with plasmids encoding the NSP4 protein or the nonglycosylated form of VP7, or with both plasmids simultaneously. At 24 hpt, the cells were fixed and immunostained for NSP4 and VP7. In cells in which the plasmid for VP7 was transfected alone, the monomeric form of VP7 (MAb M60) was clearly visible, whereas there was no signal with MAb 159, which detects the trimer; in contrast, when the plasmids for VP7 and NSP4 were cotransfected, trimeric VP7 was detected and colocalized with NSP4 (Fig. 11). These results confirm that the presence of NSP4 is relevant (directly or indirectly) for the correct assembly of VP7 into trimers.

Distinct domains of GBF1 are essential for rotavirus replication. To explore the potential involvement of the different GBF1 domains in rotavirus progeny production, we compared the replication of the virus in HEK293 cells transfected with the GBF1 construct containing the A795E mutation (GBF1/795) that confers resistance to BFA (47, 58) or with a series of mutant GBF1/795 proteins (Fig. 12A) (59).

For these assays, HEK293 cells were transfected with the different constructs, and at 24 hpt, the cells were infected with RRV. At 12 hpi, the total virus was harvested, and the viral yield was determined. Figure 12B shows that the full-length GBF1/795 was able to rescue the replication of rotavirus in the presence of BFA. In addition, the GBF1/795/1531t mutant was able to rescue, albeit partially, viral replication. In contrast, none of the other GBF1 mutants could support virus replication. These findings indicate that the C-terminal domain of GBF1 is not absolutely critical for replication of the virus, while all other domains of GBF1 are required.

We also tested a GBF1/795 mutant that encoded a protein with amino acid substitution E794K in the Sec7 domain (GBF1/795/E794K) that is inactive in Arf activation (60) and with a construct in which the C-terminal loop of Sec7 domain (EIVMPEE at positions 883 to 889) was disrupted by the substitution of 7 alanines, producing a GBF1 protein defective in Arf binding and activation (GBF1/795/7A) (61) (Fig. 12A). Both the catalytically inactive GBF1/795/E794K and GBF1/795/7A mutants were unable to support rotavirus replication in the presence of BFA, suggesting that the ability of GBF1 to activate Arf is important for virus progeny production. All GBF1/795 constructs had been shown to be expressed to a similar level, as determined by Western blotting (58, 59).

The previous results suggested that Arf1 activation might be important for rotavirus replication. This observation was tested by transfecting MA104 cells with an siRNA to Arf1, which very efficiently knocked down the synthesis of the protein (Fig. 12C, left),

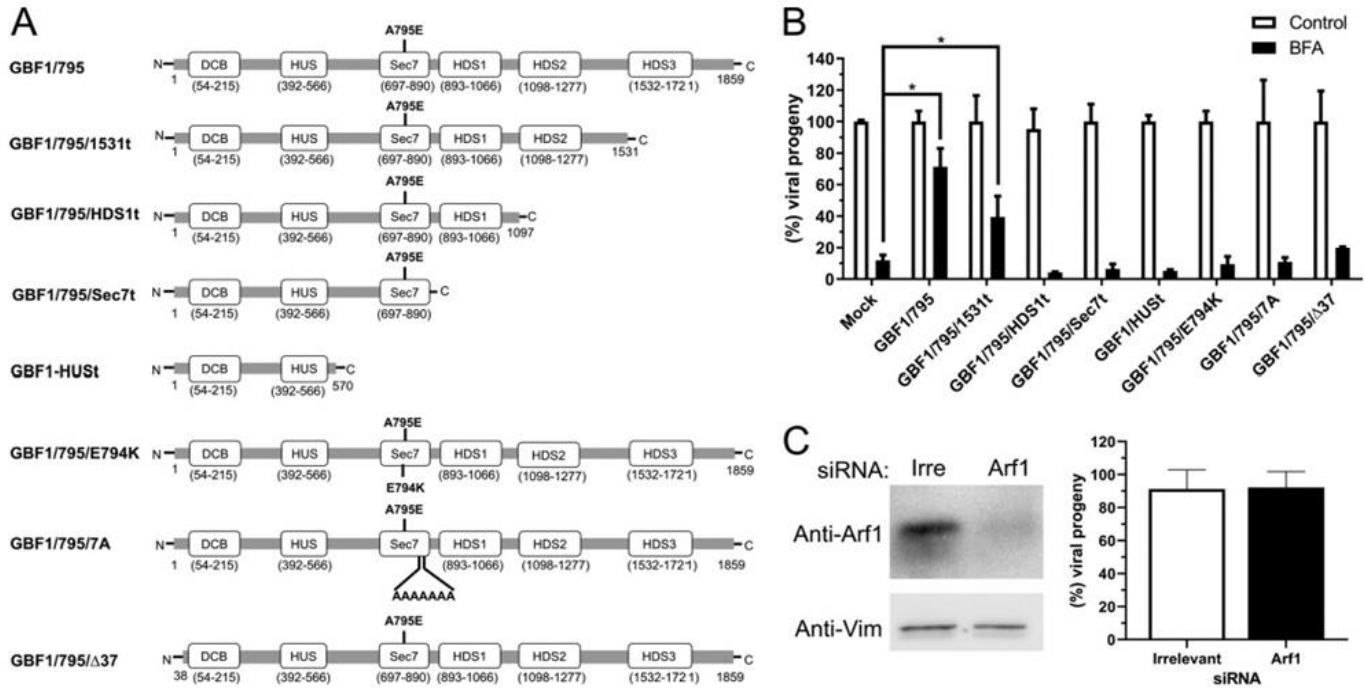


FIG 12 GBF1 catalytic activity but not Arf1 activation is essential for rotavirus replication. (A) Schematic map of GBF1 domain organization and of truncated mutants used in this study, in which the amino acid substitutions are indicated. Numbers in parentheses indicate GBF1 amino acids. (B) HEK293 cells were transfected with the different GBF1 mutant plasmids, and at 24 hpt, cells were pretreated for 30 min with BFA (0.5 μg/ml) and then infected with RRV at an MOI of 5 in the presence of BFA for 1 h. Unbound virus was removed, and fresh medium containing BFA was added. At 12 hpi, the total virus obtained from cells and media was harvested, and the viral titer was determined. Data represent the virus progeny relative to untreated cells. The arithmetic means ± standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$. (C) MA104 cells were transfected with an siRNA to Arf1. (Left panel) Representative Western blot analysis of cells transfected with the indicated siRNA. The expression of Arf1 was detected with a specific antibody. Vimentin (Vim) was used as a loading control. (Right panel) At 72 hpt, scramble siRNA and siArf1 cells were infected with RRV (MOI = 5). At 12 hpi, the total virus was collected, and the viral titer was determined. Data represent the percentages of virus progeny, where the cells transfected with an irrelevant siRNA (Irre) correspond to 100% infectivity. The arithmetic means ± standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown.

and at 72 hpt, infecting the cells with RRV. At 12 hpi, the total virus was harvested, and the viral yield was determined. Silencing the expression of Arf1 did not affect the yield of viral progeny compared to that produced in cells transfected with a control, irrelevant siRNA (Fig. 12C, right). These results suggest that GBF1 catalytic activity is essential for rotavirus replication, but the activation of Arf1 is not required.

DISCUSSION

Eukaryotic cells use elaborated systems to control the traffic of proteins between different organelles. The COPI/Arf1 machinery has been shown to participate in several of these transport processes, including its recent involvement in maturation and function of lipid droplets (LDs) (30–32). The COPI/Arf1 complex is also emerging as an important cellular factor for the replication of several RNA viruses. In the case of influenza virus (62, 63) and vesicular stomatitis virus (VSV) (64, 65), the COPI/Arf1 complex seems to play a role in their entry process. Moreover, for VSV as well as for hepatitis C virus (66–68), mouse hepatitis coronavirus (69), chikungunya virus (70), poliovirus (58, 59, 71), coxsackievirus (72), and classical swine fever virus (73), COPI/Arf1 has been shown to be necessary for genome replication as well as for viral protein expression. COPI/Arf1 has also been shown to be critical for viral particle assembly of influenza virus and the Chandipura virus (63, 74). The specific mechanism through which COPI and Arf1 participate in these processes has not been characterized; however, GBF1, involved in the first step of the COPI/Arf1 transport process, has been shown to play an important role for the replication of some of these viruses. For example, for enteroviruses, the recruitment of GBF1 to the membranous structures where the viral RNA synthesis takes place, mediated by the viral 3A protein, is crucial

for genome replication. Moreover, in this case, the function of GBF1 appears independent of Arf1 activation (58, 75).

In this work, we studied the effect of inhibiting the function of the GBF1/COPI/Arf1 machinery on the replication of rotavirus using the pharmacological inhibitors BFA and GCA. We found that both inhibitors induced a significant reduction in the progeny production of different rotavirus strains belonging to different G and P serotypes, indicating that these drugs block a common pathway for all these viruses.

GCA inhibits the COPI/Arf1 machinery activity by selectively inhibiting GBF1; BFA, on the other hand, also inhibits BIG1 and BIG2 (49, 76). BIG1 and BIG2 are involved in vesicular traffic of clathrin-coated vesicles at the TGN (77–79). Our observations suggest that GBF1, and not the BIG proteins, is the factor targeted by BFA and GCA that causes the reduction of rotavirus replication. The importance of GBF1 was confirmed since knocking down the expression of GBF1 by RNAi decreased the infectivity of RRV by about 70%.

In line with previous observations, we found that in cells treated with BFA and infected with RRV, the electrophoretic mobility of both VP7 and NSP4 was modified. Although it has been clearly demonstrated that the modification of NSP4 is due to oligosaccharide processing (21), the modification of VP7 is currently unknown. Since no infectious virus was produced under those conditions, it was also proposed that the altered oligosaccharide processing of VP7 was responsible for the defective assembly of viral particles (21). Our results indicate that for VP7, the altered electrophoretic mobility is independent of its glycosylation pattern, since both the nonglycosylated VP7 of the SA11-CL28 virus and a recombinant VP7 protein with the N-glycosylation site mutated showed an altered mobility in the presence of the drugs. These results are in agreement with previous findings showing that cell treatment with both BFA and tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation (80), produces a VP7 protein with altered mobility (21). In addition, the changes in VP7 mobility were not due to O-glycosylation nor phosphorylation of the protein. The possibility that the drugs block the removal of the signal peptide of VP7 (81) remains to be explored.

The observation that silencing the expression of GBF1 induced changes in the mobility of both VP7 and NSP4 suggests that the activity of this cellular factor is essential for the correct processing of both proteins. Taking into consideration that GBF1 functions at the ER-Golgi interface and that rotaviruses mature in the ER, it seems likely that Golgi-ER transport is the relevant process required for the correct maturation of rotavirus infectious particles. However, considering that LDs have been proposed to play a significant role in the replication cycle of rotaviruses, it remains possible that the protein transport between the ER membrane and LDs is needed for the correct processing of both VP7 (glycosylation independent) and NSP4. However, an unknown function of GBF1 cannot be discarded.

Since the assembly of VP7 onto DLPs has been suggested to require VP7 trimerization, the effect of the drugs on trimerization was evaluated. We found that VP7 was not able to trimerize (as judged by the lack of recognition of VP7 by MAb 159, which specifically interacts with the trimeric form but not with the monomeric form of the protein [18]) in the presence of the inhibitors or in cells where the GBF1 expression was silenced. Our findings differ from previous observations that BFA has minimal effects on the antigenicity of VP7 (as judged by recognition by MAb 159 in immunoperoxidase staining [21]). The reason for this discrepancy might be the methods employed for the detection of the MAb159 signal—immunofluorescence in our work versus immunoperoxidase staining in the previous report (21)—which may have different sensitivity.

The drug-induced modification of VP7 could, in principle, prevent its trimerization. However, it is also possible that the modification of NSP4 could impair VP7 trimerization. Even if the NSP4 function as a receptor in the ER membrane is not affected by the drug treatments, it is plausible that the modifications in its glycosylation pattern could affect its role in facilitating (directly or indirectly) the trimerization of VP7 during the removal of the envelope in the last step of virus assembly. The role of NSP4 in the trimerization of VP7 is supported by earlier observation where tunicamycin, an inhibitor

of N-glycosylation, restricts the maturation of enveloped particles of SA11-CL28 by inhibiting the glycosylation of NSP4 (82). On the other hand, it is known that the stability of the VP7 trimers depends on the presence of calcium (Ca^{2+}) (15, 18), suggesting that alteration in the calcium homeostasis of the cell could be responsible for the lack of the outer layer assembly of rotaviruses. It has been shown that rotavirus infection increases the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane, leading to an enhancement of its intracellular concentration, but that BFA inhibits this enhancement (83). Thus, it cannot be excluded that the deficient trimerization of VP7 is due to altered calcium homeostasis.

The multidomain structure of GBF1 allows it to engage in numerous interactions with other cellular, as well as viral, proteins (33, 59, 75). To gain information about the importance of the different domains of GBF1 in rotavirus replication, we tested the ability of different truncated forms of GBF1 to support the production of virus progeny in the presence of BFA. A recombinant full-length GBF1 carrying a mutation in the Sec7 domain that renders the protein resistant to the inhibitory action of BFA (GBF1/795) was able to rescue virus replication, as did a mutant GBF1 protein lacking the C-terminal HDS3 domain (albeit less well), suggesting that HDS3 is dispensable for viral replication. Although the precise function of HDS3 is unknown, it appears essential for GBF1 membrane association, since the GBF1/795/1531t mutant is inefficiently targeted to the Golgi complex, remaining predominantly cytosolic, albeit some fraction of this mutant is able to associate with the membranes (unpublished results). It is possible that the small fraction of the GBF1/795/1531t mutant that is able to associate with membranes is capable of activating sufficient Arf molecules to allow the life cycle of the virus to proceed.

The catalytically inactive mutants of GBF1 (GBF1/795/E794K and GBF1/795/7A) failed to support replication of the virus, suggesting that GBF1 activity is essential for rotavirus progeny production. Although the catalytic activity of GBF1 appears essential for rotavirus replication, we found that the activation of Arf1 is not required, since knocking down the expression of this factor does not affect the production of infectious virus. Thus, it is likely that rotavirus replication requires the activation of other GBF1 substrates, such as Arf4 or Arf5 (37–39), that could compensate for the reduced level of Arf1.

Previous findings reported that the most N-terminal 37 amino acids of GBF1 are important for the replication of coxsackie B3 virus and poliovirus (58, 59, 75, 84) by targeting the 3A protein to membranes where the virus replication complexes will assemble. Similarly, we showed that this deletion renders GBF1 unable to support rotavirus replication in the presence of BFA. It is possible that this 37-amino-acid stretch could bind a rotaviral protein, although it may also interact with a cellular factor to support virus replication. In fact, it has been reported that Rab1b is able to interact with the N terminus of GBF1 to modulate GBF1 function in the secretory pathway (85). Further experiments will have to be carried out to explore in more detail the mechanism through which GBF1 supports rotavirus replication.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. MA104 rhesus monkey kidney epithelial cells (ATCC) and HEK293 human embryonic cells stably expressing phage T7 polymerase, kindly provided by Carlos Sandoval Jaime (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Mexico) (56), were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium-reduced serum (DMEM-RS; Thermo Scientific HyClone, Logan, UT) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Biowest, Kansas City, MO) at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Simian (RRV, G3P5B [3]; SA11, G3P5B [2]; and SA11-CL28, G3P5B [2]), bovine (UK, G6P7 [5]), porcine (YM, G11P9 [7]), and human (69M, G8P4 [10]) rotaviruses were propagated in MA104. Briefly, the viruses were activated with trypsin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 30 min at 37°C. Afterwards, the activated viruses were adsorbed to the cells for 1 h at 37°C. The unbound virus was removed, and the cells were incubated for 16 h at 37°C. Finally, the cells were lysed by two cycles of freeze-thawing, and the cell debris was removed by centrifugation. The resulting viral lysate was stored at -70°C .

Reagents and antibodies. Brefeldin A (B7651; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in ethanol, and Golgicide A (345862; Calbiochem, San Diego, CA, USA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Monoclonal antibodies (MAbs) to the monomeric (M60) and trimeric (159) forms of VP7 (53) were kindly provided by H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA, USA). The rabbit anti-

rotavirus polyclonal serum raised against purified TLPs (52) and the rabbit polyclonal sera to NSP2 (86) and NSP4 (87), as well as the rabbit polyclonal sera to human vimentin (52), were produced in our laboratory. Mouse monoclonal antibody to GBF1 was purchased from BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA). Goat anti-mouse Alexa Fluor 488, goat anti-mouse Alexa Fluor 647, and goat anti-rabbit Alexa Fluor 568-conjugated antibodies used as secondary antibodies were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA).

siRNAs and plasmids. The small interfering RNAs (siRNAs) to GBF1 and Arf1 and the control siGENOME nontargeting siRNA were purchased from GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO, USA). For the construction of pcDNA3-VP7 and pcDNA3-NSP4 plasmids, the VP7 and NSP4 genes were cloned from extracts of RRV- and SA11-infected cells, respectively. The cDNA was obtained by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using specific primers for amplifying the open reading frame (ORF) of VP7 or NSP4 and cloned into pcDNA3 (Life Technologies, USA) as KpnI-EcoRI fragments. The pcDNA3-nonglycosylated VP7 plasmid was obtained by site-directed mutagenesis of the glycosylated VP7 of RRV. Vaccinia virus capping enzyme expression plasmids pCAG-D1R and pCAG-D12L (Addgene plasmids 89160 and 89161, respectively) were a gift from T. Kobayashi (Osaka University, Osaka, Japan). All GBF1 (UniProtKB accession no. Q92538) truncations were introduced into the backbone of Venus-tagged-GBF1/A795E (described in reference 57) using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit from Agilent Technology. The GBF1/795/E794K construct was generated by introducing the A795E mutation into the GFP-tagged GBF1 E794K-GFP construct (described in reference 59). Following PCR, constructs were transformed into XL10-Gold cells. DNA was isolated, and all mutations were confirmed by sequencing. The GBF1/795/7A construct has been described previously (61). The GBF11/795/ Δ 37 construct has been described previously (58).

Immunoperoxidase assay. MA104 cells were grown in 96-well plates to confluence. The cells were then infected with 2-fold serial dilutions of the different viral lysates for 1 h at 37°C. After this time, the nonadsorbed virus was removed, and the cells were incubated at 37°C for 16 h. Afterwards, the cells were fixed with 80% acetone in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature and then washed twice with PBS. The fixed monolayers were then incubated with a rabbit anti-rotavirus polyclonal serum, followed by incubation with a secondary anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase. Finally, the cells were washed twice with PBS and stained with a solution of 1 mg/ml of carbazole (3-amino-9-ethylcarbazole [AEC]) in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5) with 0.04% H₂O₂. The reaction was stopped by washing in tap water, and the infectious focus-forming units were counted in a Nikon TMS inverted phase-contrast microscope with a 20 \times objective.

Transfection of siRNAs and plasmids. Transfection of siRNAs into MA104 cells was performed with Oligofectamine reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 48-well plates using a reverse transfection method as described previously (88). Plasmids were transfected either into MA104 cells or HEK293 cells constitutively expressing the T7 polymerase, using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Enrichment of viral particles. RRV (at a multiplicity of infection [MOI] of 5) was adsorbed to MA104 cells for 1 h at 4°C to allow the virus to bind to the cells. The unbound virus was removed, and the cells were incubated at 37°C to allow the infection to proceed. At different times postinfection, cells were washed with EGTA (3 mM) for 5 s to release any viral particles that remained bound to the cell surface, and the cells were lysed by freeze-thawing. Viral lysates were centrifuged at 105,000 $\times g$ for 1 h at 4°C in a 45 Ti rotor using a Beckman ultracentrifuge (OptimaL-90). The supernatant was discarded, and the viral particles in the pellet were resuspended in 4 ml TNC buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂), extracted with trichloromonofluoromethane (Genetron; CYDSA 11, Mexico City, Mexico) and placed on top of a 1-ml 40% sucrose cushion in TNC. The samples were centrifuged at 195,000 $\times g$ for 2 h at 4°C in a SW55 Ti rotor. Finally, the resulting pellets containing the semipurified viral particles were dissolved in TNC and analyzed by SDS-PAGE.

Isopycnic gradient. MA104 cells were infected with RRV at an MOI of 5 in the presence of either 0.5 μ g/ml BFA or 10 μ M GCA, and at 12 hpi, the cells were lysed by freeze-thawing. The cell lysate was extracted with trichloromonofluoromethane as described above, and the aqueous phase was mixed with 2.2 g of CsCl and TNC buffer up to 5 ml. The samples were centrifuged at 158,000 $\times g$ for 18 h at 4°C on an SW55 Ti rotor (Beckman). Finally, the opalescent bands corresponding to TLPs and DLPs were collected by puncture with a syringe and stored at 4°C. Before use, the viral particles were desalted in a Sephadex G25 spin column.

Transmission electron microscopy. MA104 cells were seeded onto sapphire discs and infected with RRV at an MOI of 250 viroplasm forming units (VFU)/ml in the presence of 0.5 μ g/ml BFA or 10 μ M GCA. At 6 hpi, the cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 100 mM Na/K-phosphate buffer, pH 7.4, for 1 h at 4°C and kept in 100 mM Na/K-phosphate buffer overnight at 4°C. Afterwards, samples were postfixed in 1% osmium tetroxide in 100 mM Na/K-phosphate buffer for 1 h at 4°C and dehydrated in a graded ethanol series starting at 70%, followed by two changes in acetone and embedded in Epon. Ultrathin sections (60 to 80 nm) were cut and stained with uranyl acetate and lead citrate. Images were acquired using a transmission electron microscope (CM12; Philips, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a charge-coupled device (CCD) camera (Ultrascan 1000; Gatan, Pleasanton, CA, USA) at an acceleration of 100 kV and processed using ImageJ version 2.0.0-rc-69/1.52i (Creative Commons [http://imagej.net/contributors]).

Metabolic labeling of proteins. MA104 cells were pretreated with BFA (0.5 μ g/ml) or GCA (10 μ M) for 30 min. Afterwards, the cells were mock infected or infected with RRV (MOI of 5) in the presence of inhibitors for 1 h. At the end of the adsorption period, the cells were washed, and fresh medium

containing the drugs was added. At 7 hpi, the cells were starved for 30 min in the methionine-free medium before pulse-labeling with 25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of Easy Tag Express ^{35}S labeling mix (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) for 30 min. At 8 hpi, cells were washed three times, and the monolayers were incubated in complete medium before lysis in Laemmli sample buffer at 10 hpi. The radiolabeled proteins were resolved by 10% SDS-PAGE followed by autoradiography.

For [^3H]mannose radiolabeling, cells were treated and infected as described above. At 6 hpi, the cells were starved in a glucose-free medium for 30 min followed by labeling with 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of mannose- D -[2- ^3H (N)] (Perkin Elmer, Shelton, CT) for 1.5 h. At 8 hpi, the ^3H -labeling medium was removed, and the cells were incubated in complete medium before lysis in Laemmli sample buffer at 10 hpi. The radiolabeled proteins were resolved by 10% SDS-PAGE, followed by fluorography.

Western blot analysis. Proteins in cell lysates were separated in a SDS-PAGE and transferred to Immobilon NC membranes (Millipore Merck, Darmstadt, Germany). The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies diluted in PBS containing 0.1% nonfat dry milk. The membranes were then incubated with the corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. The peroxidase activity was developed using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. The blots were also probed with an anti-vimentin antibody used as a loading control.

Endoglycosidases and phosphatase treatments. The pcDNA3-VP7 plasmid was transfected in MA104 cells; BFA or GCA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added at 1 hpi, and the cells were lysed (7.6% SDS, 125 mM Tris HCl, pH 6.8) at 18 hpi. Cell extracts underwent treatment with one of the following enzymes according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA): PNGase F (peptide- N -glycosidase F), Endo H (endo- β - N -acetylglucosaminidase-H), a protein deglycosylation mixture, and λ -phosphatase.

Immunofluorescence. MA104 cells grown on glass coverslips were pretreated with BFA (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or GCA (10 μM) for 30 min and then infected with rotavirus at an MOI of 1. Six hpi, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. After this time, the cells were washed four times with 50 mM NH_4Cl in PBS and permeabilized by incubation with 0.5% Triton X-100 for 15 min at room temperature. The coverslips were incubated in blocking buffer (1% bovine serum albumin) for 1 h at room temperature (RT) and then with primary antibodies diluted in blocking buffer overnight at 4°C. The cells were then washed five times and incubated with the Alexa Fluor-labeled secondary antibodies in blocking buffer for 1 h at RT. Finally, cell nuclei were stained with 30 nM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, Eugene, OR, USA) for 5 min, and the coverslips were mounted onto glass slides with CitiFluor AF1 antifade (Electron Microscopy Sciences, Emsdassum, Hatfield, PA, USA). Images were acquired with an inverted 3I spinning disk confocal microscope (Zeiss Observer Z.1) coupled to a digital EMCCD Andor Ixon (512 by 512 pixels) and processed using Fiji ImageJ 1.52n (89).

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated by the Mann-Whitney-Wilcoxon test using GraphPad Prism 8.0.2. (GraphPad Software Inc.). The homogeneity of variances was confirmed by a Fligner Killeen test using R 3.6.0.

ACKNOWLEDGMENTS

J.L.M. is the recipient of a scholarship from CONACyT.

This work was partially supported by grant IG200317 from DGAPA/UNAM, by grant A1-5-15356 from the National Council for Science and Technology, CONACyT-Mexico, and by the University of Zurich. The funders had no role in study design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Estes M, Greenberg H. 2007. Rotaviruses, p 1347–1401. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (ed), Fields virology, 6th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Trask SD, McDonald SM, Patton JT. 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 10:165–177. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>.
- Patton JT, Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Taraporewala ZF. 2006. Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:169–187.
- Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Tortorici MA, Taraporewala ZF. 2007. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv Virus Res* 69:167–201. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69004-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69004-0).
- Chasey D. 1977. Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. *J Gen Virol* 37:443–451. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-37-3-443>.
- Poruchynsky MS, Atkinson PH. 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* 65:4720–4727.
- Both GW, Siegman LJ, Bellamy AR, Atkinson PH. 1983. Coding assignment and nucleotide sequence of simian rotavirus SA11 gene segment 10: location of glycosylation sites suggests that the signal peptide is not cleaved. *J Virol* 48:335–339.
- Au KS, Mattion NM, Estes MK. 1993. A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein ns28. *Virology* 194:665–673. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1306>.
- Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK. 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol* 63:4553–4562.
- O'Brien JA, Taylor JA, Bellamy AR. 2000. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *J Virol* 74:5388–5394. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.11.5388-5394.2000>.
- Maass D, Atkinson PH. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol* 64:2632–2641.
- Bergmann CC, Maass D, Poruchynsky MS, Atkinson PH, Bellamy AR. 1989. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J* 8:1695–1703. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03561.x>.
- Petrie BL, Graham DY, Estes MK. 1981. Identification of rotavirus particle types. *Intervirology* 16:20–28. <https://doi.org/10.1159/000149243>.
- Suzuki H, Konno T, Numazaki Y. 1993. Electron microscopic evidence for

- budding process-independent assembly of double-shelled rotavirus particles during passage through endoplasmic reticulum membranes. *J Gen Virol* 74:2015–2018. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-9-2015>.
15. Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS. 1990. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* 110:2133–2144. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.6.2133>.
 16. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV. 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* 75:6052–6061. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6052-6061.2001>.
 17. Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. 2009. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* 324:1444–1447. <https://doi.org/10.1126/science.1170481>.
 18. Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC. 2000. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* 277:420–428. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0625>.
 19. Silva-Ayala D, López T, Gutiérrez M, Perrimon N, López S, Arias CF. 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10270–10275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304932110>.
 20. Green VA, Pelkmans L. 2016. A systems survey of progressive host-cell reorganization during rotavirus infection. *Cell Host Microbe* 20:107–120. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.005>.
 21. Mirazimi A, Von Bonsdorff CH, Svensson L. 1996. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology* 217:554–563. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0150>.
 22. Popoff V, Adolf F, Brugger B, Wieland F. 2011. COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a005231. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005231>.
 23. Griffiths G, Pepperkok R, Locker JK, Kreis TE. 1995. Immunocytochemical localization of beta-COP to the ER-Golgi boundary and the TGN. *J Cell Sci* 108:2839–2856.
 24. Duden R, Griffiths G, Frank R, Argos P, Kreis TE. 1991. Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell* 64:649–665. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90248-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90248-W).
 25. Gu F, Aniento F, Parton RG, Gruenberg J. 1997. Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J Cell Biol* 139:1183–1195. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.5.1183>.
 26. Daro E, Sheff D, Gomez M, Kreis T, Mellman I. 1997. Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatomer (COPI) component epsilon-COP. *J Cell Biol* 139:1747–1759. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1747>.
 27. Botelho RJ, Hackam DJ, Schreiber AD, Grinstein S. 2000. Role of COPI in phagosome maturation. *J Biol Chem* 275:15717–15727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910068199>.
 28. Razi M, Chan EYW, Tooze SA. 2009. Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J Cell Biol* 185:305–321. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810098>.
 29. Lay D, Gorgas K, Just WW. 2006. Peroxisome biogenesis: where Arf and coatomer might be involved. *Biochim Biophys Acta* 1763:1678–1687. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2006.08.036>.
 30. Beller M, Sztalryd C, Southall N, Bell M, Jäckle H, Auld DS, Oliver B. 2008. COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol* 6:2530–2549. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060292>.
 31. Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, Wong JS, Vale RD, Walter P, Farese RV. 2008. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453:657–661. <https://doi.org/10.1038/nature06928>.
 32. Wilfling F, Thiam AR, Olarte M-J, Wang J, Beck R, Gould TJ, Allgeyer ES, Pincet F, Bewersdorf J, Farese RV, Walther TC. 2014. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *eLife* 3:e01607. <https://doi.org/10.7554/eLife.01607>.
 33. Kaczmarek B, Verbavatz JM, Jackson CL. 2017. GBF1 and Arf1 function in vesicular trafficking, lipid homeostasis and organelle dynamics. *Biol Cell* 109:391–399. <https://doi.org/10.1111/boc.201700042>.
 34. Hsu VW, Yang J-S. 2009. Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett* 583:3758–3763. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.056>.
 35. Beck R, Ravet M, Wieland FT, Cassel D, Cassel D. 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 583:2701–2709. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.032>.
 36. Anders N, Jürgens G. 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci* 65:3433–3445. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8227-7>.
 37. Claude A, Zhao B-P, Kuziemycki CE, Dahan S, Berger SJ, Yan J-P, Arnold AD, Sullivan EM, Melançon P. 1999. GBF1: a novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* 146:71–84.
 38. Niu T, Pfeifer AC, Lippincott-Schwartz J, Jackson CL. 2005. Dynamics of GBF1, a brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* 16:1213–1222. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0599>.
 39. Szul T, Garcia-Mata R, Brandon E, Shestopal S, Alvarez C, Sztul E. 2005. Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic* 6:374–385. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00282.x>.
 40. Morinaga N, Adamik R, Moss J, Vaughan M. 1999. Brefeldin A inhibited activity of the sec7 domain of p200, a mammalian guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem* 274:17417–17423. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17417>.
 41. Togawa A, Morinaga N, Ogasawara M, Moss J, Vaughan M. 1999. Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem* 274:12308–12315. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12308>.
 42. Shin H-W, Morinaga N, Noda M, Nakayama K. 2004. BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome identity. *Mol Biol Cell* 15:5283–5294. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-05-0388>.
 43. Ramaen O, Joubert A, Simister P, Belgareh-Touzé N, Olivares-Sanchez MC, Zeeh J-C, Chantalat S, Golinelli-Cohen M-P, Jackson CL, Biou V, Cherfils J. 2007. Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 282:28834–28842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705525200>.
 44. Bhatt JM, Viktorova EG, Wyrozumska P, Lin H, Belov GA, Busby T, Kahn RA, Sztul E, Wright J, Lee E, Newman LE. 2016. Oligomerization of the Sec7 domain Arf guanine nucleotide exchange factor GBF1 is dispensable for Golgi localization and function but regulates degradation. *Am J Physiol Cell Physiol* 310:C456–C469. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00185.2015>.
 45. Bouvet S, Golinelli-Cohen M-P, Contremoulin V, Jackson CL. 2013. Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J Cell Sci* 126:4794–4805. <https://doi.org/10.1242/jcs.134254>.
 46. Ellong EN, Soni KG, Bui QT, Sougrat R, Golinelli-Cohen MP, Jackson CL. 2011. Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the arf1 activator GBF1. *PLoS One* 6:e21889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021889>.
 47. Meissner JM, Bhatt JM, Lee E, Styers ML, Ivanova AA, Kahn RA, Sztul E. 2018. The ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 is targeted to Golgi membranes through a PIP-binding domain. *J Cell Sci* 131:jcs210245. <https://doi.org/10.1242/jcs.210245>.
 48. Chen J, Wu X, Yao L, Yan L, Zhang L, Qiu J, Liu X, Jia S, Meng A. 2017. Impairment of cargo transportation caused by gbf1 mutation disrupts vascular integrity and causes hemorrhage in zebrafish embryos. *J Biol Chem* 292:2315–2327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.767608>.
 49. Sáenz JB, Sun WJ, Chang JW, Li J, Bursulaya B, Gray NS, Haslam DB. 2009. Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat Chem Biol* 5:157–165. <https://doi.org/10.1038/nchembio.144>.
 50. Mossessova E, Corpina RA, Goldberg J. 2003. Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol Cell* 12:1403–1411. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00475-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00475-1).
 51. Estes MK, Graham DY, Ramig RF, Ericson BL. 1982. Heterogeneity in the structural glycoprotein (VP7) of simian rotavirus SA11. *Virology* 122:8–14. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90372-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90372-5).
 52. Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, Lopez S. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* 79:184–192. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.184-192.2005>.
 53. Shaw RD, Vo PT, Offit PA, Coulson BS, Greenberg HB. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* 155:434–451. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90205-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90205-9).
 54. Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR. 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol* 85:625–634. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19611-0>.
 55. Cuadras MA, Bordier BB, Zambrano JL, Ludert JE, Greenberg HB. 2006. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs:

- insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J Virol* 80:3935–3946. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3935-3946.2006>.
56. Sandoval-Jaime C, Green KY, Sosnovtsev SV. 2015. Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *J Virol Methods* 217:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.003>.
 57. Kanai Y, Komoto S, Kawagishi T, Nouda R, Nagasawa N, Onishi M, Matsuura Y, Taniguchi K, Kobayashi T. 2017. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2349–2354. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618424114>.
 58. Belov GA, Feng Q, Nikovics K, Jackson CL, Ehrenfeld E. 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 4:e1000216. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000216>.
 59. Belov GA, Kovtunovych G, Jackson CL, Ehrenfeld E. 2010. Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell Microbiol* 12:1463–1479. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01482.x>.
 60. García-Mata R, Szul T, Alvarez C, Sztul E. 2003. ADP-ribosylation factor/COP1-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell* 14:2250–2261. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0730>.
 61. Lowery J, Szul T, Seetharaman J, Jian X, Su M, Forouhar F, Xiao R, Acton TB, Montelione GT, Lin H, Wright JW, Lee E, Holloway ZG, Randazzo PA, Tong L, Sztul E. 2011. Novel C-terminal motif within Sec7 domain of guanine nucleotide exchange factors regulates ADP-ribosylation factor (ARF) binding and activation. *J Biol Chem* 286:36898–36906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230631>.
 62. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann H-H, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tscherne DM, Ortigoza MB, Liang Y, Gao Q, Andrews SE, Bandyopadhyay S, De Jesus P, Tu BP, Pache L, Shih C, Orth A, Bonamy G, Miraglia L, Ideker T, García-Sastre A, Young JAT, Palese P, Shaw ML, Chanda SK. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463:813–817. <https://doi.org/10.1038/nature08699>.
 63. Sun E, He J, Zhuang X. 2013. Dissecting the role of COPI complexes in influenza virus infection. *J Virol* 87:2673–2685. <https://doi.org/10.1128/JVI.02277-12>.
 64. Cureton DK, Burdeinick-Kerr R, Whelan S. 2012. Genetic inactivation of COPI coatomer separately inhibits vesicular stomatitis virus entry and gene expression. *J Virol* 86:655–666. <https://doi.org/10.1128/JVI.05810-11>.
 65. Irurzun A, Pérez L, Carrasco L. 1993. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett* 336:496–500. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80863-p](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80863-p).
 66. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, Duverlie G, Ciczora Y, Wychowski C, Dubuisson J, Rouille Y. 2010. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 84:773–787. <https://doi.org/10.1128/JVI.01190-09>.
 67. Farhat R, Goueslain L, Wychowski C, Belouzard S, Fénéant L, Jackson CL, Dubuisson J, Rouille Y. 2013. Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin A-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS One* 8:e74491-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074491>.
 68. Lebsir N, Goueslain L, Farhat R, Callens N, Dubuisson J, Jackson CL, Rouille Y. 2018. Functional and physical interaction between the Arf activator GBF1 and hepatitis C virus NS3 protein. *J Virol* 93:e01459-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01459-18>.
 69. Verheije MH, Raaben M, Mari M, Te Lintelo EG, Reggiori F, van Kuppeveld FJM, Rottier PJM, de Haan C. 2008. Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathog* 4:e1000088. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000088>.
 70. Zhang N, Zhang L. 2017. Key components of COPI and COPII machineries are required for chikungunya virus replication. *Biochem Biophys Res Commun* 493:1190–1196. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.142>.
 71. Belov GA, Ehrenfeld E. 2007. Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle* 6:36–38. <https://doi.org/10.4161/cc.6.1.3683>.
 72. Lanke KHW, van der Schaar HM, Belov GA, Feng Q, Duijsings D, Jackson CL, Ehrenfeld E, van Kuppeveld F. 2009. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* 83:11940–11949. <https://doi.org/10.1128/JVI.01244-09>.
 73. Liang W, Zheng M, Bao C, Zhang Y. 2017. CSFV proliferation is associated with GBF1 and Rab2. *J Biosci* 42:43–56. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9659-0>.
 74. Rajasekharan S, Rana J, Gulati S, Sharma SK, Gupta V, Gupta S. 2013. Predicting the host protein interactors of Chandipura virus using a structural similarity-based approach. *Pathog Dis* 69:29–35. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12064>.
 75. Wessels E, Duijsings D, Lanke KHW, Melchers WJG, Jackson CL, van Kuppeveld F. 2007. Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J Virol* 81:5238–5245. <https://doi.org/10.1128/JVI.02680-06>.
 76. Shen X, Xu K-F, Fan Q, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Vaughan M. 2006. Association of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (BIG2) with recycling endosomes during trans-ferrin uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2635–2640. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510599103>.
 77. Donaldson JG, Jackson CL. 2011. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:362–375. <https://doi.org/10.1038/nrm3117>.
 78. Zhao X, Lasell TKR, Melançon P. 2002. Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell* 13:119–133. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-08-0420>.
 79. Ishizaki R, Shin H-W, Mitsuhashi H, Nakayama K. 2008. Redundant roles of BIG2 and BIG1, guanine-nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factors in membrane traffic between the trans-Golgi network and endosomes. *Mol Biol Cell* 19:2650–2660. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-10-1067>.
 80. Elbein AD. 1987. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu Rev Biochem* 56:497–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002433>.
 81. Stirzaker SC, Whitfeld PL, Christie DL, Bellamy AR, Both GW. 1987. Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 105:2897–2903. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2897>.
 82. Petrie BL, Estes MK, Graham DY. 1983. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J Virol* 46:270–274.
 83. Ruiz MC, Díaz Y, Peña F, Aristimuño OC, Chemello ME, Michelangeli F. 2005. Ca²⁺ permeability of the plasma membrane induced by rotavirus infection in cultured cells is inhibited by tunicamycin and brefeldin A. *Virology* 333:54–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.032>.
 84. Wessels E, Duijsings D, Niu T-K, Neumann S, Oorschot VM, de Lange F, Lanke KHW, Klumperman J, Henke A, Jackson CL, Melchers WJG, van Kuppeveld F. 2006. A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev Cell* 11:191–201. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.06.005>.
 85. Monetta P, Slavin I, Romero N, Alvarez C. 2007. Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* 18:2400–2410. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-1005>.
 86. González RA, Torres-Vega MA, López S, Arias CF. 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* 143:981–996. <https://doi.org/10.1007/s007050050347>.
 87. Maruri-Avidal L, López S, Arias CF. 2008. Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J Virol* 82:5368–5380. <https://doi.org/10.1128/JVI.02751-07>.
 88. Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, López S. 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 84:9161–9169. <https://doi.org/10.1128/JVI.00731-10>.
 89. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

ANEXO II

Artículo publicado en “eLIFE”

Nanoscale organization of rotavirus replication machineries

Nanoscale organization of rotavirus replication machineries

Yasel Garcés Suárez^{1†}, Jose L Martínez^{1†}, David Torres Hernández^{1,2}, Haydee Olinca Hernández^{1,2}, Arianna Pérez-Delgado¹, Mayra Méndez³, Christopher D Wood^{1,2}, Juan Manuel Rendon-Mancha³, Daniela Silva-Ayala^{1†}, Susana López¹, Adán Guerrero^{1,2*}, Carlos F Arias^{1*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico;

²Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ³Centro de Investigación en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

Abstract Rotavirus genome replication and assembly take place in cytoplasmic electron dense inclusions termed viroplasm (VPs). Previous conventional optical microscopy studies observing the intracellular distribution of rotavirus proteins and their organization in VPs have lacked molecular-scale spatial resolution, due to inherent spatial resolution constraints. In this work we employed super-resolution microscopy to reveal the nanometric-scale organization of VPs formed during rotavirus infection, and quantitatively describe the structural organization of seven viral proteins within and around the VPs. The observed viral components are spatially organized as five concentric layers, in which NSP5 localizes at the center of the VPs, surrounded by a layer of NSP2 and NSP4 proteins, followed by an intermediate zone comprised of the VP1, VP2, VP6. In the outermost zone, we observed a ring of VP4 and finally a layer of VP7. These findings show that rotavirus VPs are highly organized organelles.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.001>

***For correspondence:**

adanog@ibt.unam.mx (AÁG);
arias@ibt.unam.mx (CFA)

[†]These authors contributed equally to this work

Present address: [†]Harvard Medical School, Boston, United States

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 14

Received: 17 October 2018

Accepted: 22 July 2019

Published: 25 July 2019

Reviewing editor: Arup K Chakraborty, Massachusetts Institute of Technology, United States

© Copyright Garcés Suárez et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

Rotavirus is a non-enveloped virus composed of three concentric layers of proteins that enclose a genome constituted by eleven segments of double stranded RNA (dsRNA) that encode six structural proteins (VP1 to VP4, VP6 and VP7) and six non-structural proteins (NSP1 to NSP6). The inner layer is formed by dimers of VP2 that enclose the viral genome and small numbers of molecules of the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, and the capping enzyme, VP3. This nucleoprotein complex constitutes the core of the virus, which is surrounded by an intermediate protein layer of trimers of VP6, to form double-layered particles (DLPs). The surface of the virion is occupied by two polypeptides, VP7, a glycoprotein, and VP4, which forms spikes that protrude from the VP7 shell (*Estes and Greenberg, 2013*). Replication of the rotavirus genome and assembly of DLPs take place in cytoplasmic electron dense inclusions termed viroplasm (VPs) (*Estes and Greenberg, 2013*). Once the double-shelled particles are assembled, they bud from the cytoplasmic VPs into the adjacent endoplasmic reticulum (ER). During this process, which is mediated by the interaction of DLPs with the ER transmembrane viral protein NSP4, the particles acquire a temporary lipid bilayer, modified by VP7 and NSP4, which after being removed in the lumen of the ER by an unknown mechanism, yields the mature triple-layered virions (*Estes and Greenberg, 2013*). It has been reported that VP4 is located between the VP and the ER membrane and it is incorporated into triple-layered

eLife digest Rotaviruses are small viruses that can infect cells in the intestine. They are responsible for most cases of severe infectious diarrhea, the most common cause of death among young children in developing countries. Controlling the spread of rotavirus infections is difficult, even with high levels of hygiene, so effective treatments are essential to curtail the virus' infections. Understanding how new rotaviral particles are made in infected cells is one of the first steps toward developing new therapies.

Once rotaviruses enter the cells, proteins from the virus and the cell aggregate into compact spheres called viroplasm to make new viral particles. Studying these viroplasms used to be difficult because they are too small to see with the resolution of standard microscopes. In recent years, advances in microscopy and mathematical methods have focused on breaking the existing resolution limits, leading to the development of super-resolution microscopy. This new technique has made it possible to study objects with sizes in the order of a billionth of a meter, known as nanoscopic structures, including viroplasms.

Garcés et al. use super-resolution microscopy to determine how viral proteins are arranged in the viroplasm and gain a better understanding of how the viruses are assembled. The images revealed that, in infected monkey kidney cells, rotavirus proteins inside the viroplasm form highly organized concentric layers. This arrangement is reliably repeated in viroplasms of different sizes, indicating that the organization of the proteins is likely set up when the viroplasm starts to form.

These findings make use of new microscopy, image analysis and statistical tools to study rotaviruses, providing a new framework to understand many aspects of rotaviral biology. Additionally, the result showing that proteins organize consistently in viroplasms is a first step towards understanding how the machinery that makes new rotaviruses works, which could lead to future treatments for severe infectious diarrhea.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.002>

particles (TLPs) during the budding process and maturation of the virus particle inside the ER (Estes and Greenberg, 2013; Navarro et al., 2016).

The viral non-structural proteins NSP2 and NSP5 serve a nucleation role that is essential for the biogenesis of VPs (Fabbretti et al., 1999; Silvestri et al., 2004; Vascotto et al., 2004; Campagna et al., 2005). In addition to viral proteins and genomic dsRNA, cellular proteins such as ER chaperones (Maruri-Avidal et al., 2008), proteins associated with lipid droplets (Cheung et al., 2010), and ribonuclear proteins (Dhillon et al., 2018), have been shown to colocalize with VPs. Several studies have characterized the intracellular distribution of the rotavirus proteins (González et al., 2000; Petrie et al., 1982; Petrie et al., 1984; Richardson et al., 1986). Immunofluorescence studies, based upon epifluorescence or confocal microscopy, have described the viral proteins that conform the VPs, however the images are inherently diffraction-limited to a spatial resolution in the range of hundreds of nanometer, precluding the identification of the nanoscopic molecular scale organization of VPs (González et al., 1998; González et al., 2000; Eichwald et al., 2004; López et al., 2005b; Criglar et al., 2014; Martin et al., 2011; Contin et al., 2010). On the other hand, transmission electron microscopy (TEM) studies often provide images with nanometric resolution, nevertheless, immunoelectron microscopy is challenging when looking for the localization of more than a single protein (Altenburg et al., 1980; Petrie et al., 1982; Petrie et al., 1984). Over the past 15 years, a variety of super-resolution microscopy (SRM) techniques have been developed to observe subcellular structures beneath the diffraction limit of optical microscopes, with resolutions in the tens of nanometers (Schnitzbauer et al., 2017; Deschout et al., 2014; Cox et al., 2011). In this work, we determined the organization of rotaviral proteins within and around VPs through the 'Bayesian Blinking and Bleaching' (3B) SRM technique. We developed a segmentation algorithm to automatically analyze and quantify the relative distribution of seven viral proteins, and propose a model that describes their relative spatial distribution. Also, we present a dependency model that explains the relationship between the viral proteins. This work establishes a structural framework for VP organization that future mechanistic and functional studies must take into account, and establishes key methodologies for future investigations on this subject.

Results

Qualitative analysis of VP morphology and structure through SRM

Rotavirus VPs are complex signaling hubs composed of viral and cellular proteins, packed together with viral RNAs. By TEM, they roughly resemble circular electron-dense structures whose internal components lack an obvious degree of spatial organization (Altenburg *et al.*, 1980; Eichwald *et al.*, 2012). In this work, we determined the relative spatial distribution of VPs components by immunofluorescence and SRM in MA104 cells infected with the rhesus rotavirus strain RRV at 6 hr post-infection (hpi), using protein-specific antibodies. Due to their important role as nucleating factors during VP biogenesis, we selected either NSP2 or NSP5 as spatial relative reference for the distribution of the VP1, VP2 and VP6 proteins. VPs were optically sectioned through total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF), with an excitation depth of field restricted to 200 nm from the coverslip. This approach avoids excitation of fluorophores marking structural components located away from this plane, that is towards the inner cellular milieu. Additionally, NSP2 was also co-immunostained with the viral outer layer protein VP4 as well as with the ER resident proteins NSP4 and VP7, all of which have been reported to form separate ring-like structures that closely associate with VPs (González *et al.*, 2000). In order to gain more insight into the morphogenesis of rotavirus, we analyzed the distribution of both VP7 monomers (VP7-Mon) and trimers (VP7-Tri) since this protein is assembled into virus particles in the latter form (Kabcenell *et al.*, 1988). The nanoscale distribution of VPs was then analyzed through 3B-SRM, with improvements in the technique, developed in the present work, to solve nanoscopic structures ('Stochastic model fitted for 3B super resolution microscopy' Appendix 1). By different methods of analysis VPs exhibit roughly a circular shape (Figure 1A–E). However, unlike the diffraction-limited image (Figure 1B), in super-resolution microscopy structural details of VP are appreciated, like the different layer distributions of viral components with respect to NSP2 (Figure 1C–E). In addition to VPs, by diffraction-limited TIRF microscopy we

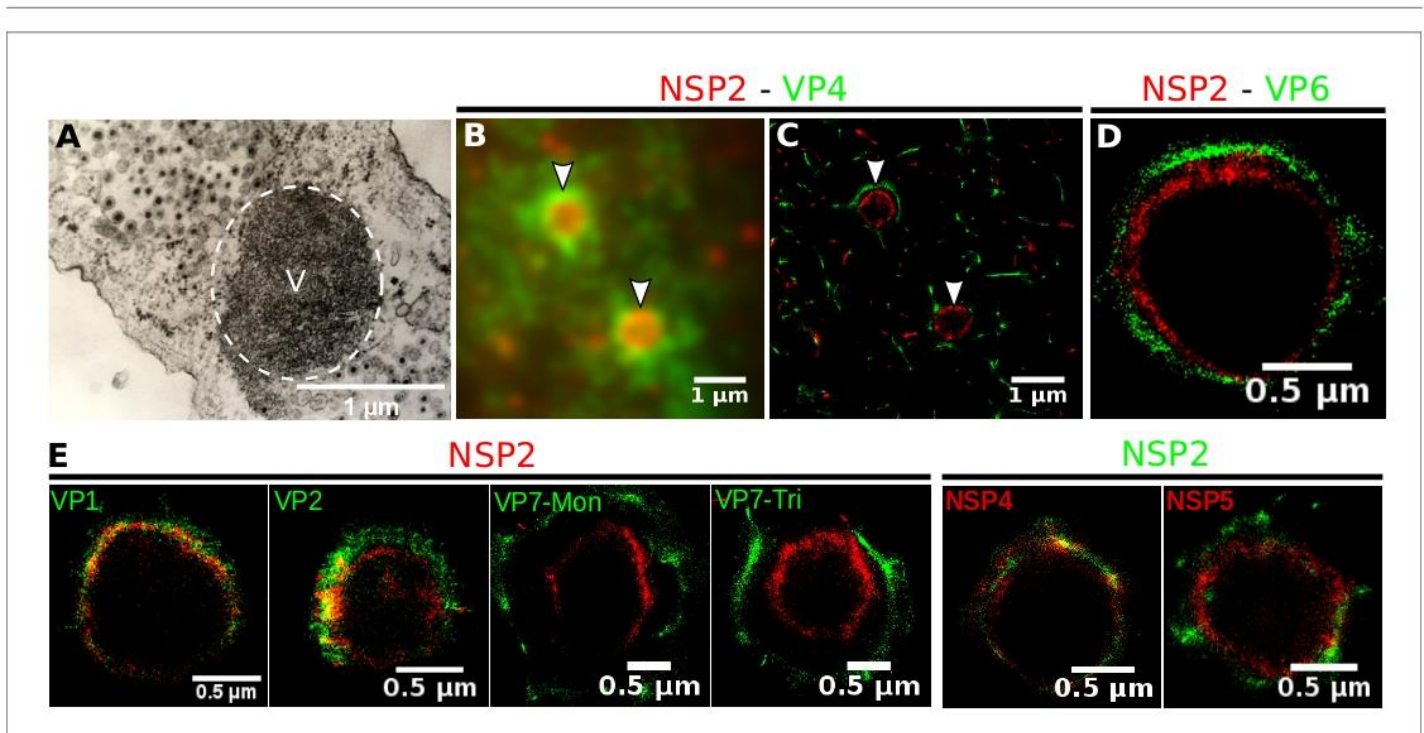


Figure 1. Relative distribution of viral components in rotavirus-VPs. RRV-infected MA104 cells (6hpi) were fixed and processed for transmission electron microscopy or immunofluorescence microscopy. (A) Transmission electron microscopy of a VP (identified by the dotted white ellipse). (B) Diffraction-limited image of VPs (white arrows). (C) 3B-SRM image reconstructed from B. (D–E) 3B-SRM images of individual VPs labeled with different antibodies (see Methods).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.003>

detected in the cytoplasm several small and dispersed puncta of fluorescence (*Figure 1B*), and in these images it is also sometimes possible to differentiate the distribution of NSP2 from that of VP4, a closely viroplasm-associated viral protein (see also *González et al., 2000*); in this case, VP4 is detected as a ring-like structure that surrounds the VP. Nevertheless, the small size of the VPs effectively precludes measurement of component distribution for the majority of its structural elements, as their separation is below the spatial resolution of typical optical microscopes. In contrast, images obtained by 3B-SRM do allow the study of the relative distribution of the VP components (*Figure 1C–E*). In the case of SRM images of VP4 (*Figure 1C*), we observed that this protein forms a ring-like structure that does not colocalize with NSP2, and also ribbon-like projections that extend towards the cytoplasm, details that were not apparent in images captured with conventional fluorescence microscopy (*Figure 1B*). Additionally, we observed that the small puncta of proteins detected in the cytoplasm were in fact ribbon-like structures composed of various viral proteins that may represent different organization forms of the viroplasmic proteins (*Figure 1C*). In this regard, it is interesting to note that both NSP2 and VP4 have been reported to have at least two different intracellular distributions (*González et al., 2000; Nejmeddine et al., 2000; Criglar et al., 2014*). An examination of 3B-SRM images of VPs (*Figure 1C–E*) revealed that the viral components form ring like structures within the VPs and are arrayed as rather discrete concentric layers. As seen in *Figure 1C–E*, we find that although the structural proteins VP1, VP2 and VP6 partially overlap in position with NSP2, the bulk of the proteins form separate and distinct layers. Also, the monomeric as well as the trimeric forms of VP7 are clearly distinguished from NSP2, forming an outer ring. Of interest, the spatial distribution of NSP4 colocalized with that of NSP2, an unexpected result since, as mentioned, NSP4 is an ER integral membrane protein (see the Discussion section), and as such it was expected to colocalize with VP7 rather than with an internal viroplasmic protein (*Petrie et al., 1984*). With regard to NSP5, it was observed distributed inside the ring formed by NSP2 (*Figure 1E*).

Quantitative characterization of VPs structure by a novel segmentation algorithm

A qualitative analysis of the distribution of the VP components through 3B-SRM suggested that these are arranged as concentric spherical shells; thus, we set out to quantitatively validate the circularity of the VP shape. For this, we developed a segmentation algorithm based on a least squares approach, which we called 'Viroplasm Direct Least Squares Fitting Circumference' (VP-DLSFC) (see 'Segmentation Algorithm' in Appendix 1), to measure the spatial distribution of the components within individual VPs by adjusting concentric circumferences. This method is automatic, deterministic, easy to implement, and has a linear computational complexity. The performance of VP-DLSFC was tested on approximately 40,000 'ground truth' (GT) synthetic images, showing a high robustness to noise and partial occlusion scenarios. Additionally, we compared our method with two other alternative methods (*Gander et al., 1994*), and our approach displayed an improved performance (see 'Algorithm Validation' in Appendix 1). Based on this new algorithm, we find that the mean radius of the NSP5 distribution was smaller than that of NSP2, suggesting that NSP5 is located in the innermost section, as a component of the core of VPs (*Figure 2A*). On the other hand, the distribution of the structural proteins VP1, VP2 and VP6 exhibit slightly larger mean radii than that of NSP2, and are thus primarily localized in a zone surrounding NSP2. Continuing further towards the outer regions of the VP, we observed a region occupied by the spike protein VP4. Finally, the two different forms of VP7 (VP7-Mon and VP7-Tri) were located together, close to the most external region of the VPs (*Figure 2A*). The distribution of the glycoprotein NSP4 showed a similar mean radius to that of NSP2 (around $0.4\mu\text{m}$) suggesting, as described above, that these two proteins are located in the same structural layer of the VP (*Figure 2A*).

In order to confirm our preliminary observations and clarify the nanoscopic organization of the VPs, we evaluated the relative separation between NSP2 and each accompanying protein. Again, the results show a remarkable degree of organization in the structure of the VP (*Figure 2B*). As predicted from *Figure 2A*, we found that NSP5 is located in the internal part of the VP, in close proximity ($\approx 0.05\mu\text{m}$) to the area occupied by proteins NSP2 and NSP4, which themselves show the closest association. After the NSP2-NSP4 region, VP6 occupies a middle region at $\approx 0.05\mu\text{m}$ from NSP2, followed by the VP4 protein, which were located at a distance of $\approx 0.18\mu\text{m}$. Finally, the VP7-Mon and VP7-Tri were situated at $\approx 0.38\mu\text{m}$ from NSP2 (*Figure 2B*). A Mann-Whitney test showed that the

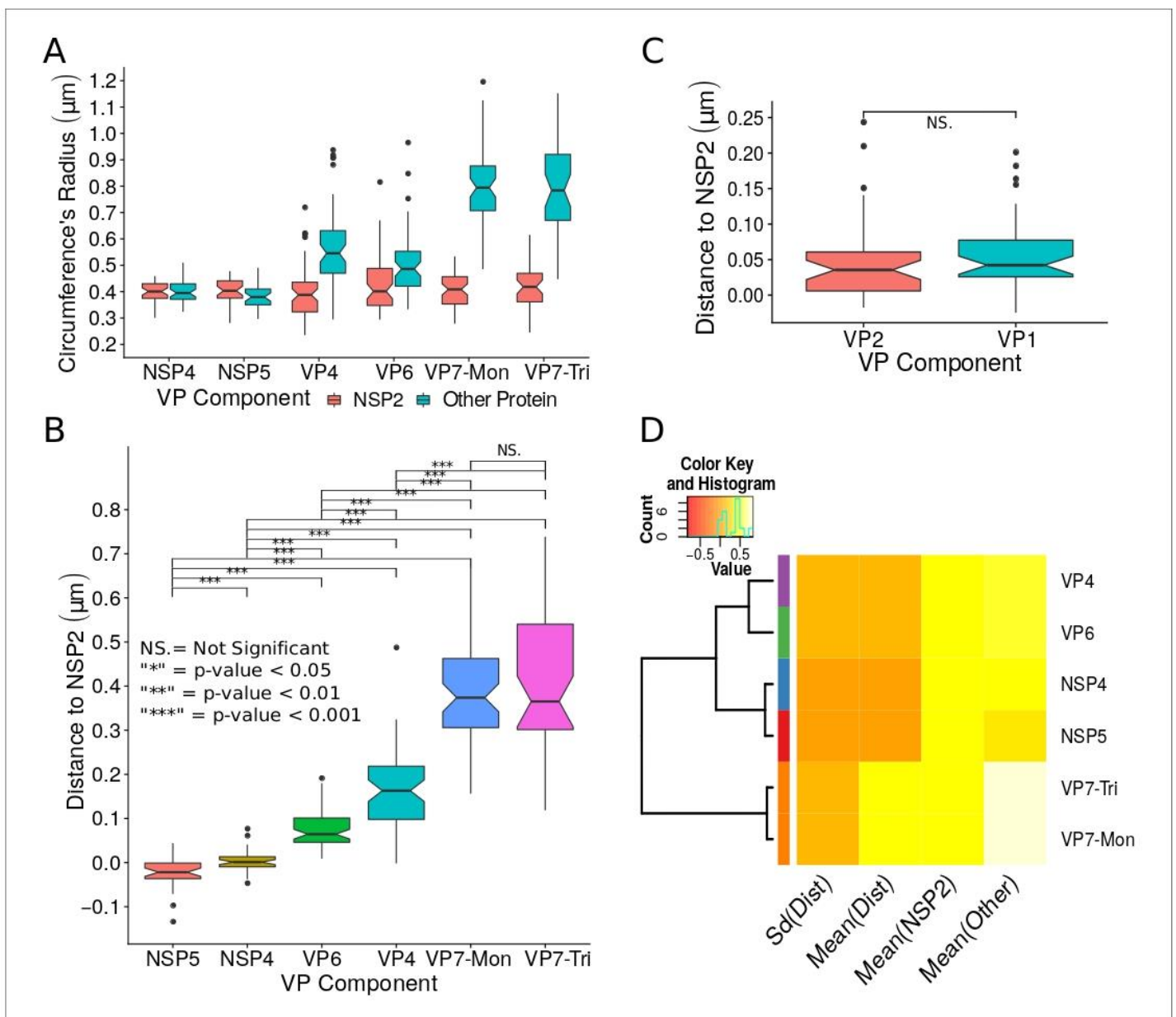


Figure 2. Exploratory analysis of the results obtained by the algorithm VPs-DLSFC. (A) Boxplot for the radius of the fitting circumferences. In each experimental condition we plot two boxes, the red box is for the radius of NSP2 (reference protein), and the blue box represents the radius of the accompanying VP components (names in x-axis). (B) Boxplot and results of the Mann-Whitney hypothesis test for the distance between each viral element and NSP2. Each combination of the Mann-Whitney test is linked by a line, and the result of the test it is above the line. Note that this test reports significant differences between the distribution of the distance to NSP2 of two different VP components. (C) Distance of VP1 and VP2 to NSP2 and result of the Mann-Whitney test. Because the distributions of NSP2 in combination with VP1 and VP2 are statistically different to the other NSP2 distributions (see **Appendix 1—figure 7B**), we show these two cases independently in this exploratory analysis. (D) Hierarchically clustered heatmap for the standard deviation of the distance to NSP2, the mean distance to NSP2, the mean radius of NSP2, and the mean radius of the accompanying protein layers, NSP5, NSP4, VP6, VP4, and VP7.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.004>

distances of the various viral components in relation to NSP2 were significantly different (**Figure 2B**), suggesting that they are situated in specific areas of the VPs. The two forms of VP7 were located at the same distance to NSP2, suggesting that the formation of trimers of VP7 takes place at the ER membrane, where the VP7 monomers should also be located. Note that in **Figure 2B** the relative

distance of VP1 and VP2 to NSP2 was not included, since the radii obtained for NSP2 in these two combinations were significantly smaller than those found when it was determined in combination with the other VP components (see 'Supplementary Exploratory Analysis'). In addition to this, we found no significant differences between the distance of both VP1 and VP2 to NSP2 (*Figure 2C*). Nonetheless, based on the inferential analysis, we could place these two proteins in the same layer as VP6 (see below).

Next, through a hierarchical cluster analysis, we studied the relationship between the components of the VP, taking into account multiple variables at the same time, like the mean distance to NSP2 ['Mean(Dist)'], the standard deviation of the distance to NSP2 ['Std(Dist)'], the mean radius of NSP2 ['Mean(NSP2)'], and the radii of the other proteins ['Mean(Other)'] (*Figure 2D*). Note that the proteins within a cluster should be as similar as possible and proteins in one cluster should be as dissimilar as possible from proteins in another. Because our variables are related with the distance to NSP2 and the radii of the proteins, this is a no-parametric analysis that should provide evidence about the spatial distribution/order of the viral proteins into the VP. As we are considering the distance to NSP2, VP1 and VP2 were not included in this analysis. The first level of the hierarchical agglomerative cluster (*Figure 2D*, left) partitioned the VPs and the surrounding proteins in five clusters, composed by NSP4, NSP5, VP6, VP4 and {VP7-Mon, VP7-Tri}, which suggest that these five proteins compose different layers of the VP. The second agglomerative level merged into the same group the proteins NSP4 and NSP5, meanwhile VP6 and VP4 continue as independent clusters, which indicate that NSP5 and NSP4 are closer to each other than to VP6 and VP4 in the VP. In the third level, VP6 and VP4 are clustered in the same group, and as consequence are more related between them than with the others viral proteins. The subsequent groups in the clustering analysis indicate that VP7 remains as an independent layer with respect to the other proteins. Based on this analysis, the viral proteins seem to be highly organized, with VP7 conforming the most external layer, while NSP5, NSP4, VP6 and VP4 are distributed very close but as independent layers. The clusters between NSP5-NSP4 and VP6-VP4 suggest that these two pairs of proteins (in each cluster) conform continuous layers in the VP.

The relative spatial organization of VPs is maintained regardless their size

The scatterplot between the radius of the spatial distribution of NSP2 (independent variable, x-axis) and the radius of the distribution of other viral components (response variable, y-axis) showed a strong linear relationship (*Figure 3A*). The distribution of NSP5 grows $0.87\mu\text{m}$ for each $1\mu\text{m}$ increase in the radius of NSP2 (slope interpretation), whereas the radius of the distribution of NSP4 increases $0.99\mu\text{m}$ (*Figure 3B*). These findings indicate that NSP5 is distributed in a proportionally smaller region than NSP2 regardless of the absolute size of the VP, supporting our observation that NSP5 is a constituent of the core of the VP. Moreover, the fact that the increase in the radius of the fitted distribution of NSP4 is directly proportional to the same parameter measured for NSP2 supports the idea that these proteins are both constituents of a putative second layer. VP1, VP2 and VP6 exhibit similar slopes which diverge between 0.03 and $0.05\mu\text{m}$ (*Figure 3B* and *Appendix 1—table 6*); thus, these results confirm that VP1, VP2 and VP6 are components of the same layer in the VPs which, from the data in *Figure 3*, is located just after the layer of NSP2 and NSP4. Finally, as noted in our quantitative analysis, VP4 and VP7 form consecutive external layers with a slope of 1.39 and $1.94\mu\text{m}$, respectively (*Figure 3B* and *Appendix 1—table 6*). These findings indicate that the spatial distribution of the viral components in the VPs and in the surrounding areas is conserved regardless of their absolute size, and also form the basis of a predictive model, where, for a given radius of distribution of NSP2, it is possible to predict the radii of the remaining VP components (NSP5, NSP4, VP1, VP2, VP6) and of VP4 and VP7 proteins. This predictive model is available as a web app at https://yasel.shinyapps.io/Nanoscale_organization_of_rotavirus_replication_machineryes/. The mathematical details and the residual analysis that validate these linear models are available in the Appendix 1, section 'Linear dependency between the viral components', *Appendix 1—table 6* and *Appendix 1—figure 9*.

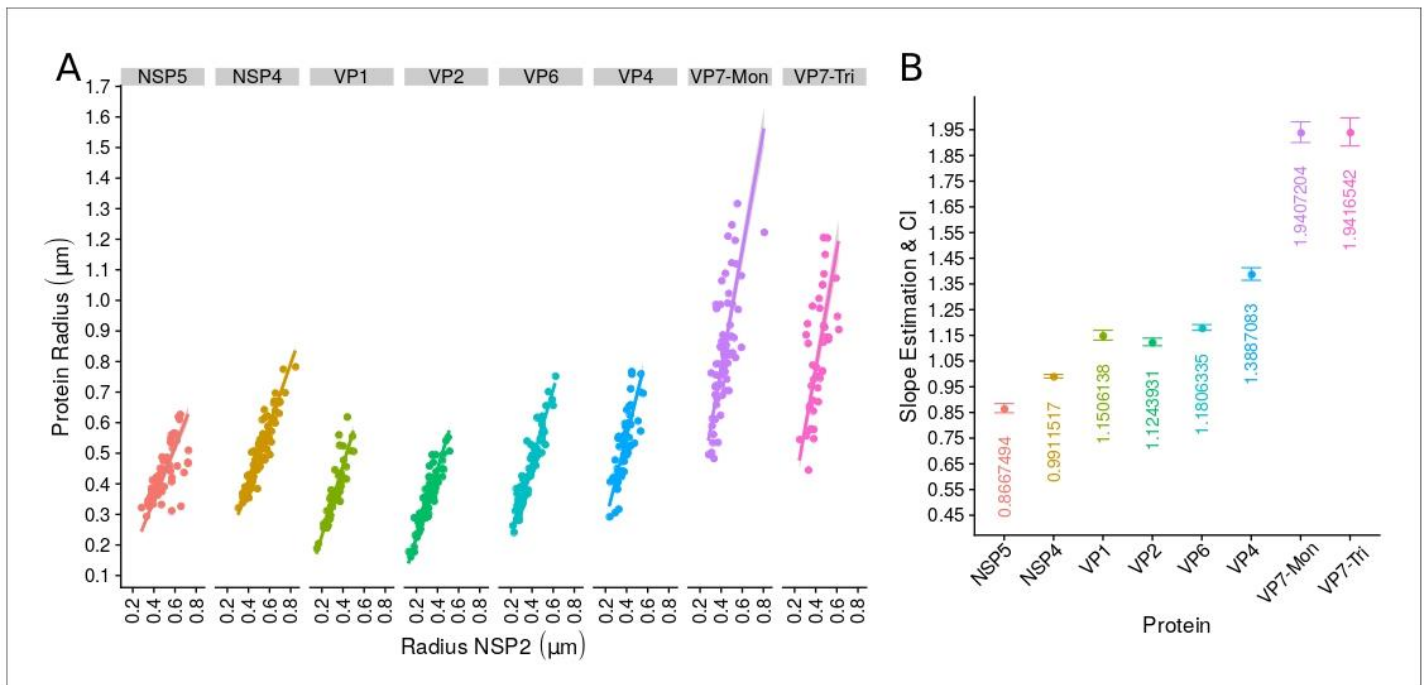


Figure 3. The organization of VPs scales with its size. (A) Simple linear regression analyses for each component combination (eight subpanels). In all subpanels, the x-axis represents the radius of the distributions of NSP2, and the y-axis the radius of the distribution of the accompanying VP component. The 95% confidence interval, marked in grey, is imperceptible due to goodness of fit of the linear regression (solid line). (B) Slope and confidence interval for each linear regression model (dependent variables in x-axis). The slopes values were shown under each confidence interval. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.005>

The structural organization of VPs is independent of the reference protein chosen for pairwise comparison

In order to confirm the observed structural organization of VPs, we analyzed two more experimental conditions in which we chose a different reference protein for pairwise comparisons. The first was based on the distribution of NSP5 and its comparison with the relative localizations of VP6 and VP4, and the second considered NSP4 as the reference protein to compare with the distribution of VP6. We found that both analyses produced an identical structural organization for the VPs, with a comparative localization error of approximately $0.05\mu\text{m}$ between models (close to the effective resolution limit of the 3B algorithm; see 'NSP5 and NSP4 as reference proteins' in Appendix 1). An extensive quantitative validation regarding the congruence between the NSP2, NSP5 and NSP4 models is available in the Appendix 1.

Based on our extensive quantitative, descriptive and inferential statistical analyses, we propose that the VP and the surrounding viral proteins form an ordered biological structure composed of at least five concentric layers organized as depicted in **Figure 4**. In this structure, NSP5 constitutes the innermost layer, followed by a {NSP2-NSP4} layer. Then, there is a layer composed by {VP1-VP2-VP6} and two consecutive external layers formed by VP4 and VP7. The different layers of proteins are most likely highly porous to allow the entry of positive-sense single-stranded viral RNA (+RNA) during genome replication and also of the antibodies used for VP staining.

Discussion

VPs have been previously studied using electron and fluorescence microscopy, however, due to the limited resolution of classic fluorescence microscopy techniques, and the difficulty of analysis of immunoelectron microscopy, the existence of any complex structural organization of the viral elements inside the VPs has not been reported. In recent years, the development of SRM has facilitated research into the nanoscale organization of a diverse range of cellular structures (**Grant et al., 2018**;

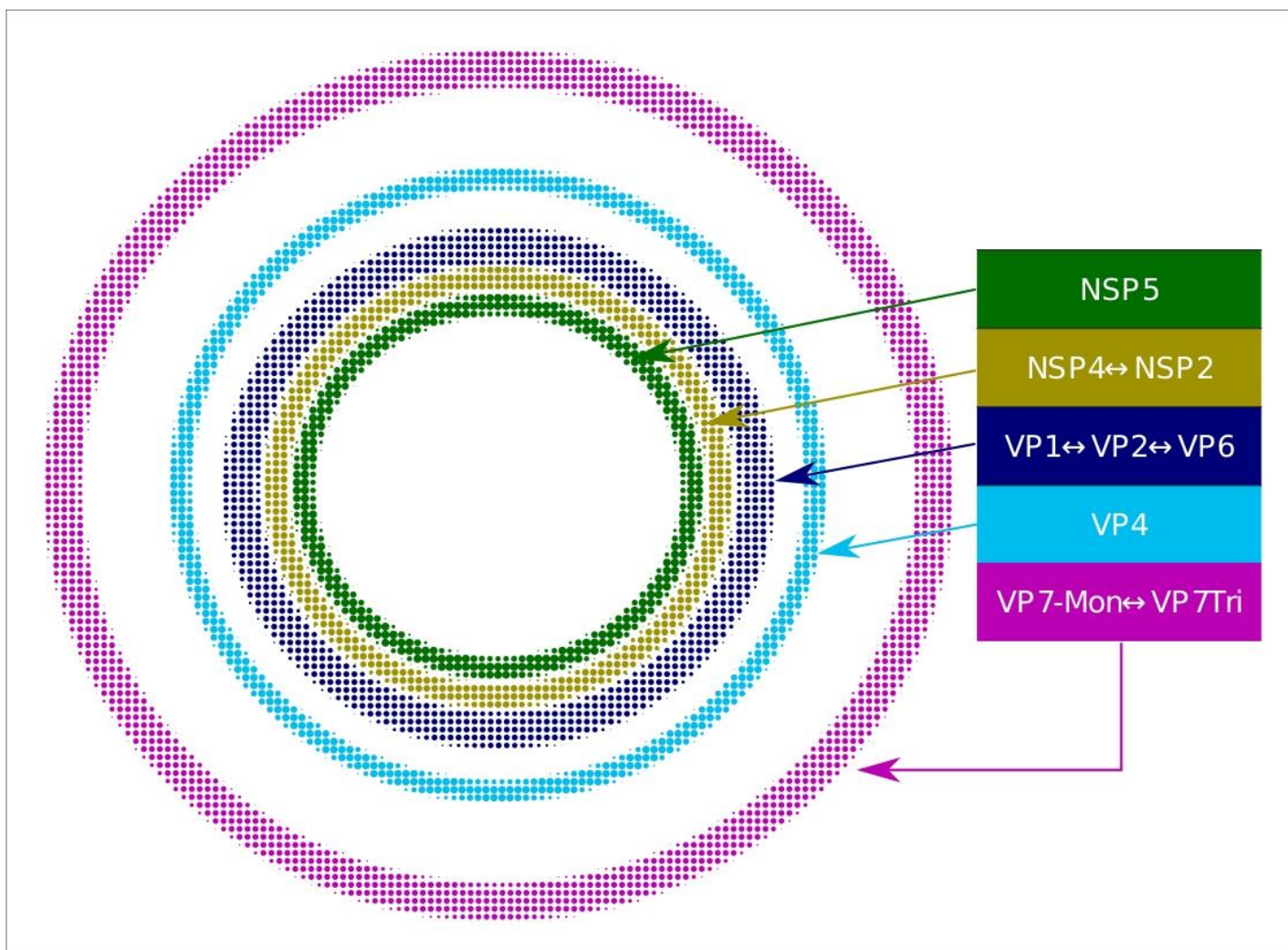


Figure 4. Relative structural distribution of VP components. The radii of the circumferences maintain the relative values determined for the different VP layers.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.006>

Reznikov et al., 2018), however, until now SRM had not been applied to study the replication cycle of rotavirus. In this work, thanks to the use of the 3B SRM algorithm, we visualized and determined quantitatively the location of several viroplasmic proteins, leading us to propose a detailed model of the VP that should be of great value for understanding virus morphogenesis.

Other SRM algorithms had been used to study the organization of viral and cellular structures showing concentric arrangements, as those proposed by *Laine et al. (2015)* and *Manetsberger et al. (2015)*. The main similarities between those studies and our approach is the use of conics, such as circles or ellipses, to fitting structures showing concentric organization. The method provided by *Manetsberger et al. (2015)* could actually be implemented to analyze our data set, which as outcome will produce similar results. This method could also provide information about the degree of asymmetry within the VP, which may be valuable to establish functional relationships between the protein distribution belts that shape these intriguing structures. The selection of the 3B SRM algorithm over other super-resolution approaches was based on the fact that this method allows to deal with samples with high density of labeling, obtaining data with a reasonable resolution, although at the cost of higher computational effort.

The quantification of the viral protein distribution within the VPs was possible thanks to a novel segmentation algorithm (VPs-DLSFC) that was proven to be robust and efficient in noisy and partial

occlusion scenarios. The manual pre-segmentation step of this algorithm was necessary in our case because we did not want to introduce any bias in the isolation of the VPs through an automatic approach. Setting aside the manual pre-segmentation step, the VPs-DLSFC algorithm is automatic, deterministic, non-iterative and has a linear computational complexity.

Previous reports have suggested that VPs have a spherical-like structure (Eichwald *et al.*, 2004; Cabral-Romero and Padilla-Noriega, 2006; Campagna *et al.*, 2013); in this study we confirmed this suggestion by comparing the VPs-DLSFC approach with a similar approach based on an ellipse adjustment (Garcés *et al.*, 2016). The results showed no significant statistical differences between these two models, and as consequence we can confidently model the structure of the VPs as a circumference. We also ratified that the center displacement of the circumferences that adjust two paired proteins are not statistically different.

Our study indicates that the viral components in the VPs, as well as VP4 and VP7, are arranged as largely discrete concentric layers (note that we are describing the structure of viroplasms, not of virus particles). This organization, however, does not preclude the interaction among the VP components proposed in this model as being located in separate layers since, for instance, NSP5 has been shown by different biochemical methods to interact with NSP2 (Eichwald *et al.*, 2004; Poncet *et al.*, 1997; Afrikanova *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2006), VP1 (Afrikanova *et al.*, 1998) and VP2 (Berois *et al.*, 2003). In this regard, based on the super resolution microscopy images, it seems clear that there is some overlapping between different protein layers, as is the case for NSP2 and NSP5 in **Figure 1E**, but also between NSP2 and VP1, VP2, VP6 and NSP4 in **Figure 1**. These general overlapping zones between different proteins most likely are relevant for coordinating the genome replication and virion assembly, as suggested. Of interest, we observed the presence of protein projections ('spike-like') from different viral shells that could also contribute to the interaction of proteins mapped to different layers (**Appendix 1—figure 8**). Although our present analysis is limited to a general characterization of the spatial distribution of the viral proteins within VPs, and not to understand specific details about the interactions between proteins in different layers, it could be used as departure point to analyze these interactions. Taking as initial solution the result of the algorithm VPs-DLSFC and the SRM image, it is possible to employ other segmentation approaches, like deformable/active contours (snakes) (Kass *et al.*, 1988), level-set (Osher and Fedkiw, 2003), or region growing methods (Mehnert and Jackway, 1997; Synthuja *et al.*, 2012), to evolve the circular contour and fit precisely the spatial distribution of the viral proteins. Then, establishing a polar coordinate system in the VP, and considering the results of both segmentation algorithms, it would be possible to quantify the radial angle in which a spike from the central distribution of a viral protein that interacts with a different protein exists. It would be also possible to determine how strong these interactions are (intersection between two segmentation curves), and to study whether the spikes are randomly distributed between layers or a specific pattern in the connection between different protein layers exists. In the latter case, this could allow us to explore whether these patterns influence the assembly of the virus-like particles or only provide a skeleton that maintain the structure of the VP. The results obtained could also be used to study topological changes that the VP might experience at different times post infection, and associate these changes with maturation of the subviral particles. In this regard, in preliminary experiments carried out at three hpi, the viral proteins in the VP have been found to have a similar 'layered' organization as shown for the mature VP at six hpi (data not shown). This observation indicates that this organization is already present when the formation of viral particles has not yet taken place, suggesting that it might be important for the assembly of DLPs within VPs. In an additional application, SRM could also be used to observe the assembly of the virus particles and the interactions that may occur of these particles in different layers of the VP. Nevertheless, to develop this idea it would be important to establish an experimental protocol to observe the viral particles during the early stages of the assembly process, to distinguish simultaneously the layers of the viroplasm and the viral particles, and to collect the SRM images with a very short acquisition rate and a very high resolution (25–30 nm), which makes this experimental plan a challenge.

Previous studies based on conventional microscopy techniques have reported that NSP5 and NSP2 colocalize (González *et al.*, 2000; Eichwald *et al.*, 2004; Fabbretti *et al.*, 1999); in contrast, we found that although NSP5 and NSP2 are located in close proximity, their positions in the VP were separable. This difference is attributable to the increased spatial resolution in the final image created by the super-resolution techniques employed in our study. Here, NSP5 was found to represent the innermost layer of the VPs, suggesting that this protein might serve as the core scaffold

upon which the subsequent viroplasmic proteins are assembled to form the VPs. This finding contrasts with a report by *Eichwald et al. (2004)*, who described that NSP5 locates to a region external to NSP2. In addition to the superior spatial resolution obtainable through 3B-SRM, compared to the traditional confocal microscopy employed in the previous report, the difference might be due to the fact that in our study we characterized the endogenous structures produced during virus replication, while *Eichwald et al.* characterized VP-like structures formed by transiently expressed proteins fused to GFP.

Immediately outside the NSP5 core, we observed a layer composed of NSP2 and NSP4 proteins. The finding that NSP4 is located in the inner part of VPs was unexpected, since it is known that NSP4 is an integral membrane protein of the ER and since it has been reported that functions as a receptor for the new DLPs located at the periphery of the VPs, during their budding towards the lumen of the ER (*Chasey, 1980; Petrie et al., 1982; Petrie et al., 1984; Au et al., 1989*). Furthermore, it has been shown that NSP4 associates with VP4 and VP7 to form a hetero-oligomeric complex that could be involved in the last steps of rotavirus morphogenesis (*Maass and Atkinson, 1990*). Based on these findings, NSP4 was expected to locate close to VP4 and VP7, in the surroundings of the VP. On the other hand, and in line with our observations, previous confocal microscopy studies have shown that a portion of NSP4 also shows a limited colocalization with NSP2 (*González et al., 2000*).

The dual location of NSP4 as an integral glycoprotein of the ER membrane and as internal to VPs, as our results indicate, is not easy to reconcile; however, in a previous work it was suggested that there are three pools of intracellular NSP4 molecules. The first pool is represented by NSP4 localized in the ER, a second minor pool localized in the ERGIC compartment, and the third pool distributed in cytoplasmic vesicular structures associated with the autosome marker LC3 (*Berkova et al., 2006*). Furthermore, in that work the authors suggested that NSP4 and autophagic marker LC3-positive vesicles may serve as a lipid membrane scaffold for the formation of large VPs by recruiting early VPs or VP-like structures formed by NSP2 and NSP5 (*Berkova et al., 2006*). This observation is in line with our model that NSP4 lies in an internal protein shell within VPs.

An additional, and very interesting possibility to explain the internal location of NSP4 in VPs is the hypothesis that VP morphogenesis occurs on the surface of lipid droplets (LDs) (*Cheung et al., 2010*). In that work, it was proposed that LDs serve as a platform to which NSP2 and NSP5 proteins attach to form VP-like structures; NSP2 octamers, in turn, associate with the viral polymerase VP1 and rotavirus +RNAs. The assorted RNA complex containing NSP2, VP1, the capping enzyme VP3 and viral +ssRNA is predicted to nucleate VP2 core assembly. In this model, core assembly results in the displacement of +RNA-bound NSP2 octamers, while VP1 within new formed cores direct dsRNA synthesis, using +RNAs as templates (*Cheung et al., 2010; Borodavka et al., 2017; Borodavka et al., 2018*). These events are followed by incorporation of the middle virus capsid protein VP6 to form DLPs. At some stage, these assemblies become VPs containing cores and DLPs and may lose some or all of their lipids (*Cheung et al., 2010*). In this regard, it is important to have in mind that the currently accepted model for the LD biogenesis is that neutral lipids are synthesized between the leaflets of the ER membrane, and the mature LD is then thought to bud from the ER membrane to form an independent organelle that is contained within a limiting monolayer of phospholipids and associated LD proteins (*Walther and Farese, 2012*). Thus, during budding of the LDs from the ER membrane they could take along rotavirus NSP4 (topologically oriented towards the cell's cytoplasm) which could help as a scaffold on the surface of LDs for the assembly of other rotavirus viroplasmic proteins, localizing then to the interior of VPs.

Further support for our model of localization of at least one pool of NSP4 molecules inside of the VPs is the observation that knocking-down the expression of NSP4 by RNA interference significantly reduces the number and size of VPs present in the cell, as well as the production of DLPs (*López et al., 2005a*). That study also showed that during RNAi inhibition of NSP4 expression the NSP2 and NSP5 proteins maintained an intracellular distribution restricted to VPs, while the VP2, VP4, VP6 and VP7 proteins failed to locate to VPs. Based on these observations, it is tempting to suggest that, in addition to the role NSP4 has on the budding of DLPs into the ER lumen, it may also play an important role as a regulator of VP assembly.

After the NSP2/NSP4 layer, we observed a middle zone composed of the structural proteins VP1, VP2 and VP6. Their location in the same zone is expected given their close association in the assembled DLPs (*Estes and Greenberg, 2013*). Also, the fact that VP1, VP2 and VP6 form a complex with

NSP2 that has replicase activity (Aponte *et al.*, 1996), suggests that the production of new DLPs could take place in this zone of the VP.

Finally, we found that VP4 and VP7 conform independent layers just external to the viroplasmic proteins. The position of these two proteins agrees with the proposed model of rotavirus morphogenesis in which VP4 is assembled first on DLPs, and subsequently VP7 binds the particles and locks VP4 in place (Trask and Dormitzer, 2006). Furthermore, the fact that VP7-Mon and VP7-Tri occupied the same layer in our model indicates that in the ER sites into which the DLPs bud, VP7 is already organized as trimers, which are subsequently assembled into the virus particles. Of interest, VP4 has been reported to exist in two different forms in infected cells. One of them is associated with microtubules (Nejmeddine *et al.*, 2000), while the other one has been reported to be found between the VP and the ER membrane (González *et al.*, 2000). In this regard, based on our findings, we suggest that the latter form of VP4 can be actually considered as an integral component of the VP. Since several studies have found the presence of different cellular proteins and lipids in association to VPs (Maruri-Avidal *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2010; Dhillon *et al.*, 2018), it will be interesting to study the relative localization of these components using the methodologies described here.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Virus strain (Rhesus rotavirus)	RRV	Harry B. Greenberg, Stanford University.		
Cell line (Cercopithecus aethiops)	MA014 cells	American Type Culture Collection	ATCC:CRL-2378.1; RRID:CVCL_3846	
Antibody	Mouse monoclonal antibody 3A8	Harry B. Greenberg, Stanford University.		IF (1:1000)
Antibody	Mouse monoclonal antibody 2G4	Harry B. Greenberg, Stanford University. PMID: 2431540		IF (1:1000)
Antibody	Mouse monoclonal antibody 255/60	Harry B. Greenberg, Stanford University. PMID: 6185436		IF (1:1000)
Antibody	Mouse monoclonal antibody M60	Harry B. Greenberg, Stanford University. PMID: 2431540		IF (1:2000)
Antibody	Mouse monoclonal antibody 159	Harry B. Greenberg, Stanford University. PMID: 2431540		IF (1:2000)
Antibody	Mouse polyclonal antibody VP1	Our Laboratory.	RRID:AB_2802095	IF (1:500)
Antibody	Mouse polyclonal antibody NSP2	Our Laboratory. PMID: 9645203	RRID:AB_2802096	IF (1:100)
Antibody	Rabbit polyclonal antibody NSP2	Our Laboratory. PMID: 9645203	RRID:AB_2802097	IF (1:2000)
Antibody	Rabbit polyclonal antibody NSP4	Our Laboratory. PMID: 18385250	RRID:AB_2802094	IF (1:1000)
Antibody	Rabbit polyclonal antibody NSP5	Our Laboratory. PMID: 9645203	RRID:AB_2802098	IF (1:2000)

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Software, algorithm	R	<i>R Development Core Team, 2017.</i> R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.r-project.org/	RRID:SCR_001905	Version 3.4.4 (2018-03-15)
Software, algorithm	Matlab	MATLAB and Statistics Toolbox Release 2018b, The MathWorks, Inc, Natick, Massachusetts, United States.	RRID:SCR_001622	
Software, algorithm	Fiji	PMID:22743772	RRID:SCR_002285	
Software, algorithm	VP-DLSFC	This paper		See 'Segmentation Algorithm' in Appendix 1.

Cell and virus

The rhesus monkey kidney epithelial cell line MA104 (ATCC) was grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium-Reduced Serum (DMEM-RS) (Thermo-Scientific HyClone, Logan, UT) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Kansas City, MO) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were confirmed to be free of mycoplasma by testing with the INTRON Mycoplasma PCR Detection Kit (#25234). Rhesus rotavirus (RRV) was obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, Calif.) and propagated in MA104 cells as described previously (*Pando et al., 2002*). Prior to infection, RRV was activated with trypsin (10 µg/ml; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) for 30 min at 37°C.

Antibodies

Monoclonal antibodies (MAbs) to VP2(3A8), VP4 (2G4), VP6 (255/60), VP7 (60) and VP7 (159) were kindly provided by H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA) (*Shaw et al., 1986; Greenberg et al., 1983*). The rabbit polyclonal sera to NSP2, NSP4 and NSP5, and the mouse polyclonal serum to NSP2 were produced in our laboratory (*González et al., 1998*). The hyperimmune serum to NSP4 (C-239) was generated in our laboratory by immunizing New Zealand white rabbits with a recombinant protein expressed in *E. coli* with a histidine-tail, representing the carboxy-terminal end (amino acids 120 to 175) of the rhesus rotavirus RRV NSP4 protein; see also *Maruri-Avidal et al. (2008)*, in which this serum was used. The hyperimmune serum to VP1 was also generated in our laboratory by immunizing BALB/c mice with a recombinant protein expressed in *E. coli* with a histidine-tail, representing amino acids 227 to 539 of the rhesus rotavirus RRV VP1 protein. Goat anti-mouse Alexa-488- and Goat anti-rabbit Alexa-568-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, Oreg.).

Immunofluorescence

MA104 cells grown on glass coverslips were infected with rotavirus RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Six hours post infection, the cells were fixed with and processed for immunofluorescence as described (*Silva-Ayala et al., 2013*). Finally, the coverslips were mounted onto the center of glass slides with storm solution (1.5% glucose oxidase +100 mM β-mercaptoethanol) to induce the blinking of the fluorophores (*Dempsey et al., 2011; Heilemann et al., 2009*).

Transmission electron microscopy

Cells grown in 75-cm² flasks were infected with rotavirus RRV at an MOI of 3 as described above. Six hours postinfection the cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde-0.1 M cacodylate (pH 7.2), postfixed with 1% osmium tetroxide, and embedded in Epon 812 resin. The ultrathin sections obtained were

stained with 2% uranyl acetate-1% lead citrate (Reynolds mix). The grids were examined with a Zeiss EM-900 electron microscope at 80 kV.

Set up of the optical microscope

All super-resolution imaging measurements were performed on an Olympus IX-81 inverted microscope configured for total internal reflection fluorescence (TIRF) excitation (Olympus, cellTIRFTM illuminator). The critical angle was set up such that the evanescence field had a penetration depth of ~200 nm (Xcellence software v1.2, Olympus soft imaging solution GMBH). The samples were continuously illuminated using excitation sources depending on the fluorophore in use. Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568 dyes were excited with a 488 nm or 568 nm diode-pumped solid-state laser, respectively. Beam selection and modulation of laser intensities were controlled via Xcellence software v.1.2. A full multiband laser cube set was used to discriminate the selected light sources (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). Fluorescence was collected using an Olympus UApo N 100x/1.49 numerical aperture, oil-immersion objective lens, with an extra 1.6x intermediate magnification lens. All movies were recorded onto a 128 × 128-pixel region of an electron-multiplying charge coupled device (EMCCD) camera (iXon 897, Model No: DU-897E-CS0-#BV; Andor) at 100 nm per pixel, and within a 50 ms interval (300 images per fluorescent excitation).

Bayesian analysis of the blinking and bleaching

Sub-diffraction images were derived from the Bayesian analysis of the stochastic Blinking and Bleaching of Alexa Fluor 488 dye (Cox *et al.*, 2011). For each super-resolution reconstruction, 300 images were acquired at 20 frames per second with an exposure time of 50 ms at full laser power, spreading the bleaching of the sample over the length of the entire acquisition time. The maximum laser power coming out of the optical fiber measured at the back focal plane of the objective lens, for the 488 nm laser line, was 23.1 mW. The image sequences were analyzed with the 3B algorithm considering a pixel size of 100 nm and a full width half maximum of the point spread function of 270 nm (for Alexa Fluor 488), measured experimentally with 0.17 μm fluorescent beads (PS-Speck™ Microscope Point Source Kit, Molecular Probes, Inc). All other parameters were set up using default values. The 3B analysis was run over 200 iterations, as recommended by the authors in Cox *et al.* (2011), and the final super-resolution reconstruction was created at a pixel size of 10 nm with the ImageJ plugin for 3B analysis (Rosten *et al.*, 2013), using parallel computing as described in Hernández *et al.* (2016). The resolution increase observed in our imaging set up by 3B analysis was up to five times below the Abbe's limit (~50 nm). The resolution provided by 3B was improved by computing the photo-physical properties of Alexa Fluor 488, and Alexa Fluor 568 dyes, which were provided to 3B algorithm, as an input parameter which encompass the probability transition matrix between fluorophore's states. The method was validated with 40 nm gattapaint nanorules (PAINT 40RG, gattaquant, Inc) labeled with ATTO 655/ATTO 542 dyes (see '3B Algorithm' in Appendix 1).

Code and statistical analysis

The segmentation algorithm (VPs-DLSFC) was developed in Matlab R2018a (9.4.0.813654) software. A detailed explanation of each the developed methods is available in Appendix 1. Statistical analysis were performed using R version 3.4.4 (2018-03-15) software. All the codes are available at https://github.com/Yasel88/Nanoscale_organization_of_rotavirus_replication_machineryes (Garcés Suárez, 2019; copy archived at https://github.com/elifesciences-publications/Nanoscale_organization_of_rotavirus_replication_machineryes).

Acknowledgements

YG received a postdoctoral fellowship from DGAPA-UNAM at the Institute of Biotechnology (IBt-UNAM). AG thanks DGTIC-UNAM for generous computing time on the Miztli supercomputer (Grant numbers: SC15-1-IR-89; SC16-1-IR-102). JLM and DTH are recipients of scholarships from CONA-CyT. HOH received a grant from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM), IN202312. Microscopy equipment was provided and maintained through CONACYT grants 123007, 232708, 260541, 280487, 293624. AG thanks CONA-CyT (No. 252213) and DGAPA-PAPIIT (No. IA202417), SL and CFA thank DGAPA-PAPIIT grant IG200317 for funding. We are thankful to IBt-UNAM for providing access to the computer cluster and to Jerome

Verleyen for his support while using it. We are also thankful to Arturo Pimentel, Andrés Saralegui and Xochitl Alvarado from LNMA-UNAM for their helpful discussions. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México	IG200317	Susana López Carlos F Arias
Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México	IA202417	Adán Guerrero
Universidad Nacional Autónoma de México	SC15-1-IR-89	Adán Guerrero
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología	252213	Adán Guerrero
Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México	IN202312	Haydee Olinca Hernández
Universidad Nacional Autónoma de México	SC16-1-IR-102	Adán Guerrero

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Yasel Garcés Suárez, Data curation, Software, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing; Jose L Martínez, Conceptualization, Supervision, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing; David Torres Hernández, Investigation, Visualization, Methodology; Haydee Olinca Hernández, Software, Validation, Investigation, Visualization, Methodology; Arianna Pérez-Delgado, Daniela Silva-Ayala, Investigation, Methodology; Mayra Méndez, Software, Validation, Investigation, Writing—review and editing; Christopher D Wood, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Juan Manuel Rendon-Mancha, Supervision, Investigation; Susana López, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Writing—review and editing; Adán Guerrero, Conceptualization, Software, Supervision, Validation, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Carlos F Arias, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Yasel Garcés Suárez  <https://orcid.org/0000-0001-8401-8352>

Jose L Martínez  <https://orcid.org/0000-0002-0529-7558>

Juan Manuel Rendon-Mancha  <http://orcid.org/0000-0002-9629-7050>

Adán Guerrero  <https://orcid.org/0000-0002-4389-5516>

Carlos F Arias  <https://orcid.org/0000-0003-3130-4501>

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.040>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.041>

Additional files

Supplementary files

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42906.007>

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files.

References

- Afrikanova I, Fabbretti E, Burrone OR, Miozzo MC. 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *Journal of General Virology* **79** Pt 11:2679–2686. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-11-2679>
- Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. 1980. Ultrastructural study of Rotavirus replication in cultured cells. *Journal of General Virology* **46**:75–85. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-1-75>, PMID: 6243348
- Altman DG, Bland JM. 2005. Standard deviations and standard errors. *BMJ* **331**:903. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7521.903>, PMID: 16223828
- Aponte C, Poncet D, Cohen J. 1996. Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *Journal of Virology* **70**:985–991. PMID: 8551639
- Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK. 1989. Receptor activity of Rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Journal of Virology* **63**:4553–4562. PMID: 2552139
- Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK. 2006. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *Journal of Virology* **80**:6061–6071. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02167-05>, PMID: 16731945
- Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J. 2003. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of Virology* **77**:1757–1763. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.1757-1763.2003>, PMID: 12525609
- Borodavka A, Dykeman EC, Schrimpf W, Lamb DC. 2017. Protein-mediated RNA folding governs sequence-specific interactions between Rotavirus genome segments. *eLife* **6**:e27453. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27453>, PMID: 28922109
- Borodavka A, Desselberger U, Patton JT. 2018. Genome packaging in multi-segmented dsRNA viruses: distinct mechanisms with similar outcomes. *Current Opinion in Virology* **33**:106–112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.001>, PMID: 30145433
- Brown R. 2007. Fits circles to 2D data using nonlinear least squares to minimise geometric error. <https://la.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/15060-fitcircle-m> [Accessed January 20, 2017].
- Cabral-Romero C, Padilla-Noriega L. 2006. Association of Rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **101**:603–611. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600006>
- Campagna M, Eichwald C, Vascotto F, Burrone OR. 2005. RNA interference of Rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *Journal of General Virology* **86**:1481–1487. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80598-0>, PMID: 15831961
- Campagna M, Marcos-Villar L, Arnoldi F, de la Cruz-Herrera CF, Gallego P, González-Santamaría J, González D, Lopitz-Otsoa F, Rodríguez MS, Burrone OR, Rivas C. 2013. Rotavirus viroplasm proteins interact with the cellular SUMOylation system: implications for viroplasm-like structure formation. *Journal of Virology* **87**:807–817. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01578-12>, PMID: 23115286
- Carreño-Torres JJ, Gutiérrez M, Arias CF, López S, Isa P. 2010. Characterization of viroplasm formation during the early stages of Rotavirus infection. *Virology Journal* **7**:350. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-350>, PMID: 21114853
- Chambers J, Cleveland W, Kleiner B, Tukey P. 1983. *Graphical Methods for Data Analysis (Statistics)*. Chapman and Hall.
- Chasey D. 1980. Investigation of immunoperoxidase-labelled Rotavirus in tissue culture by light and electron microscopy. *Journal of General Virology* **50**:195–200. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-1-195>, PMID: 6255085
- Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, Chwetzoff S, Trugnan G, Keshavan N, Lever A, Desselberger U. 2010. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in Viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *Journal of Virology* **84**:6782–6798. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01757-09>, PMID: 20335253
- Contin R, Arnoldi F, Campagna M, Burrone OR. 2010. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *Journal of General Virology* **91**:1782–1793. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.019133-0>, PMID: 20200190
- Cox S, Rosten E, Monypenny J, Jovanovic-Talman T, Burnette DT, Lippincott-Schwartz J, Jones GE, Heintzmann R. 2011. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nature Methods* **9**:195–200. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1812>, PMID: 22138825

- Criglar JM, Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Broughman JR, Prasad BV, Estes MK. 2014. A novel form of Rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *Journal of Virology* **88**:786–798. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03022-13>, PMID: 24198401
- Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, Bates M, Zhuang X. 2011. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nature Methods* **8**:1027–1036. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1768>, PMID: 22056676
- Deschout H, Cella Zancachi F, Mlodzianoski M, Diaspro A, Bewersdorf J, Hess ST, Braeckmans K. 2014. Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nature Methods* **11**:253–266. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2843>, PMID: 24577276
- Dhillon P, Tandra VN, Chorghade SG, Namsa ND, Sahoo L, Rao CD. 2018. Cytoplasmic relocalization and colocalization with viroplasm of host cell proteins, and their role in Rotavirus infection. *Journal of Virology* **92**:e00612-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00612-18>, PMID: 29769336
- Eichwald C, Rodríguez JF, Burrone OR. 2004. Characterization of Rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *Journal of General Virology* **85**:625–634. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19611-0>, PMID: 14993647
- Eichwald C, Arnoldi F, Laimbacher AS, Schraner EM, Fraefel C, Wild P, Burrone OR, Ackermann M. 2012. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLOS ONE* **7**:e47947. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047947>, PMID: 23110139
- Estes M, Greenberg H. 2013. Rotaviruses. In: Knipe D, Howley P, Cohen J, Griffin D, Lamb R, Martin M, Racaniello V, Roizman B (Eds). *Fields Virology*. Sixth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. p. 1347–1401.
- Fabbretti E, Burrone OR, Afrikanova I, Vascotto F. 1999. Two non-structural Rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *Journal of General Virology* **80 Pt 2**:333–339. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-333>
- Fitzgibbon A, Pilu M, Fisher RB. 1999. Direct least square fitting of ellipses. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **21**:476–480. DOI: <https://doi.org/10.1109/34.765658>
- Gander W, Golub GH, Strebel R. 1994. Least-squares fitting of circles and ellipses. *Bit* **34**:558–578. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01934268>
- Garcés Y, Guerrero A, Hidalgo P, López RE, Wood CD, Gonzalez RA, Rendón-Mancha JM. 2016. Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment. *Scientific Reports* **6**:36505. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep36505>, PMID: 27819325
- Garcés Suárez Y. 2019. Nanoscale organization of rotavirus replication machineries. *GitHub*. 959a366. https://github.com/Yasel88/Nanoscale_organization_of_rotavirus_replication_machineries
- González RA, Torres-Vega MA, López S, Arias CF. 1998. In vivo interactions among Rotavirus nonstructural proteins. *Archives of Virology* **143**:981–996. DOI: <https://doi.org/10.1007/s007050050347>, PMID: 9645203
- González RA, Espinosa R, Romero P, López S, Arias CF. 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident Rotavirus proteins in infected cells. *Archives of Virology* **145**:1963–1973. DOI: <https://doi.org/10.1007/s007050070069>, PMID: 11043954
- Grant MJ, Loftus MS, Stoja AP, Kedes DH, Smith MM. 2018. Superresolution microscopy reveals structural mechanisms driving the nanoarchitecture of a viral chromatin tether. *PNAS* **115**:4992–4997. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1721638115>, PMID: 29610353
- Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of Rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* **39**:91–99. PMID: 6185436
- Heilemann M, van de Linde S, Mukherjee A, Sauer M. 2009. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition* **48**:6903–6908. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200902073>, PMID: 19670280
- Hernández H, Hidalgo P, Wood C, González R, Guerrero A. 2016. Parallelizing the Bayesian Analysis of Blinking and Bleaching for Super-Resolution Microscopy. In: Gitler I, Klapp J (Eds). *High Performance Computer Applications*. **595** Springer. p. 356–366. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32243-8_25
- Hollander M, Wolfe D, Chicken E. 2013. *Nonparametric Statistical Methods*. Third Edition. Wiley.
- Howell D. 1982. *Statistical Methods for Psychology*. Eighth Edition. Wadsworth Publishing.
- Hu YS, Nan X, Sengupta P, Lippincott-Schwartz J, Cang H. 2013. Accelerating 3B single-molecule super-resolution microscopy with cloud computing. *Nature Methods* **10**:96–97. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2335>, PMID: 23361087
- Jiang X, Jayaram H, Kumar M, Ludtke SJ, Estes MK, Prasad BV. 2006. Cryoelectron microscopy structures of Rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication. *Journal of Virology* **80**:10829–10835. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01347-06>, PMID: 16928740
- Kabcenell AK, Poruchynsky MS, Bellamy AR, Greenberg HB, Atkinson PH. 1988. Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 Rotavirus in endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **62**:2929–2941. PMID: 2839712
- Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. 1988. Snakes: active contour models. *International Journal of Computer Vision* **1**:321–331. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00133570>
- Kiefer J. 1987. *Introduction to Statistical Inference*. First Edition. Springer Texts in Statistics.
- Laine RF, Albecka A, van de Linde S, Rees EJ, Crump CM, Kaminski CF. 2015. Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nature Communications* **6**:2058–2066. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms6980>
- Lawrence R. 1953. Lawrence R (Ed). *A Textbook of Econometrics*. Peterson & Co.

- López T, Camacho M, Zayas M, Nájera R, Sánchez R, Arias CF, López S. 2005a. Silencing the morphogenesis of Rotavirus. *Journal of Virology* **79**:184–192. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.184-192.2005>, PMID: 15596814
- López T, Rojas M, Ayala-Bretón C, López S, Arias CF. 2005b. Reduced expression of the Rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *Journal of General Virology* **86**:1609–1617. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80827-0>, PMID: 15914838
- Maass DR, Atkinson PH. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *Journal of Virology* **64**:2632–2641. PMID: 2159536
- Manetsberger J, Manton JD, Erdelyi MJ, Lin H, Rees D, Christie G, Rees EJ. 2015. Ellipsoid localization microscopy infers the size and order of protein layers in Bacillus spore coats. *Biophysical Journal* **109**:2058–2066. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.023>
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics* **18**:50–60. DOI: <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>
- Martin D, Ouldali M, Ménétrey J, Poncet D. 2011. Structural organisation of the Rotavirus nonstructural protein NSP5. *Journal of Molecular Biology* **413**:209–221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.008>, PMID: 21864538
- Maruri-Avidal L, López S, Arias CF. 2008. Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of Rotavirus infectious particles. *Journal of Virology* **82**:5368–5380. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02751-07>, PMID: 18385250
- McGill R, Tukey J, Larsen W. 1978. Variations of box plots. *The American Statistician* **32**:12–16. DOI: <https://doi.org/10.1080/00031305.1978.10479236>
- Mehnert A, Jackway P. 1997. An improved seeded region growing algorithm. *Pattern Recognition Letters* **18**:1065–1071. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(97\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(97)00131-1)
- Navarro A, Williamson L, Angel M, Patton J. 2016. Rotavirus replication and reverse genetics. *Viral Gastroenteritis*:121–143. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00007-9>
- Nejmeddine M, Trugnan G, Sapin C, Kohli E, Svensson L, Lopez S, Cohen J. 2000. Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. *Journal of Virology* **74**:3313–3320. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3313-3320.2000>, PMID: 10708448
- Oehlert G. 1992. A note on the Delta method. *The American Statistician* **46**:27–29. DOI: <https://doi.org/10.2307/2684406>
- Osher S, Fedkiw R. 2003. Particle Level Set Method. In: *Level Set Methods and Dynamic Implicit Surfaces*. Applied Mathematical Sciences. Springer. p. 79–86.
- Pando V, Isa P, Arias CF, López S. 2002. Influence of calcium on the early steps of Rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1337>, PMID: 12033777
- Petrie BL, Graham DY, Hanssen H, Estes MK. 1982. Localization of Rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *Journal of General Virology* **63**:457–467. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-63-2-457>, PMID: 6296288
- Petrie BL, Greenberg HB, Graham DY, Estes MK. 1984. Ultrastructural localization of Rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Research* **1**:133–152. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(84\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0168-1702(84)90069-8), PMID: 6099654
- Poncet D, Lindenbaum P, L'Haridon R, Cohen J. 1997. In vivo and in vitro phosphorylation of Rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *Journal of Virology* **71**:34–41. PMID: 8985320
- Prybutok VR. 1989. An introduction to statistical methods and data analysis. *Technometrics* **31**:389–390. DOI: <https://doi.org/10.1080/00401706.1989.10488572>
- R Development Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria, <https://www.R-project.org>
- Rawlings J, Ekerdt J. 2013. *Chemical Reactor Analysis and Design Fundamentals*. Second Edition. Nob Hill Pub.
- Reznikov N, Bilton M, Lari L, Stevens MM, Kröger R. 2018. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. *Science* **360**:eaao2189. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aao2189>, PMID: 29724924
- Richardson SC, Mercer LE, Sonza S, Holmes IH. 1986. Intracellular localization of rotaviral proteins. *Archives of Virology* **88**:251–264. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01310879>, PMID: 3010907
- Rosten E, Jones GE, Cox S. 2013. ImageJ plug-in for bayesian analysis of blinking and bleaching. *Nature Methods* **10**:97–98. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2342>, PMID: 23361088
- Schnitzbauer J, Strauss MT, Schlichthaerle T, Schueder F, Jungmann R. 2017. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nature Protocols* **12**:1198–1228. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024>, PMID: 28518172
- Shapiro SS, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**:591–611. DOI: <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Shaw RD, Vo PT, Offit PA, Coulson BS, Greenberg HB. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus Rotavirus. *Virology* **155**:434–451. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90205-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90205-9), PMID: 2431540
- Silva-Ayala D, López T, Gutiérrez M, Perrimon N, López S, Arias CF. 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in Rotavirus cell entry. *PNAS* **110**:10270–10275. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1304932110>, PMID: 23733942
- Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of Virology* **78**:7763–7774. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7763-7774.2004>, PMID: 15220450
- Synthuja J, Suresh L, Bosco M. In: 2012. Image segmentation using seeded region growing. *International Conference on Computing, Electronics and Electrical Technologies* **2012**:576–583.

- Trask SD, Dormitzer PR. 2006. Assembly of highly infectious Rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *Journal of Virology* **80**:11293–11304. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01346-06>, PMID: 16971442
- Vascotto F, Campagna M, Visintin M, Cattaneo A, Burrone OR. 2004. Effects of intrabodies specific for Rotavirus NSP5 during the virus replicative cycle. *Journal of General Virology* **85**:3285–3290. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80075-0>, PMID: 15483242
- Ver Hoef JM. 2012. Who invented the Delta method? *The American Statistician* **66**:124–127. DOI: <https://doi.org/10.1080/00031305.2012.687494>
- Walther TC, Farese RV. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry* **81**:687–714. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>, PMID: 22524315

ANEXO III

Artículo publicado en “Viruses”

**Role of the guanine nucleotide exchange factor GBF1
in the replication of RNA viruses**

Review

Role of the Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1 in the Replication of RNA Viruses

José L. Martínez and Carlos F. Arias *

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 4510, Morelos, México; josmtz@ibt.unam.mx

* Correspondence: arias@ibt.unam.mx

Received: 10 March 2020; Accepted: 6 April 2020; Published: 24 June 2020

Abstract: The guanine nucleotide exchange factor GBF1 is a well-known factor that can activate different ADP-ribosylation factor (Arf) proteins during the regulation of different cellular vesicular transport processes. In the last decade, it has become increasingly evident that GBF1 can also regulate different steps of the replication cycle of RNA viruses belonging to different virus families. GBF1 has been shown not only to facilitate the intracellular traffic of different viral and cellular elements during infection, but also to modulate the replication of viral RNA, the formation and maturation of viral replication complexes, and the processing of viral proteins through mechanisms that do not depend on its canonical role in intracellular transport. Here, we review the various roles that GBF1 plays during the replication of different RNA viruses.

Keywords: RNA viruses; GBF1; vesicle transport

1. Introduction

Eukaryotic cells contain a collection of diverse organelles that perform specialized functions depending on the enzymatic activities of their components. Although these organelles are spatially separated, there is a dynamic interaction between them by different trafficking events, some of which are mediated by vesicle transport [1]. This transport is responsible for the proper intracellular distribution of proteins and lipids and is essential to sustain the correct function and structure of cell organelles [2–7]. In vesicle transport, the proteins and lipids to be transported are selectively concentrated on specialized membrane sites of a donor compartment and included into spherical carrier vesicles coated with specific proteins. The vesicles detach from the donor membrane and travel through the cytoplasm until they finally fuse with their target compartment to release their content [8–10].

Based on the protein elements that form the coat, three important transport vesicles have been extensively described in which the function depends on either the coatomer protein I (COPI), COPII, or clathrin [11,12]. These vesicles mediate different steps of the secretory pathway of the cell. COPII regulates the anterograde transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus [13,14], whereas COPI facilitates the transport between the Golgi cisternae as well as the retrograde transport from Golgi to the ER [15–17]. On the other hand, clathrin-coated vesicles direct the transport from the Golgi to the plasma membrane, as well as between the plasma membrane and endosomes [18] (Figure 1). Recently, besides its canonical functions in the secretory pathway, the COPI machinery has been shown to participate in the maturation of early endosomes and in recycling proteins to the plasma membrane [19,20], as well as in the maturation of phagosomes [21,22] and peroxisomes [23]. Furthermore, multiple reports suggest that COPI-vesicles are also involved in transport events related to the maturation and function of lipid droplets (LDs) [24–26].

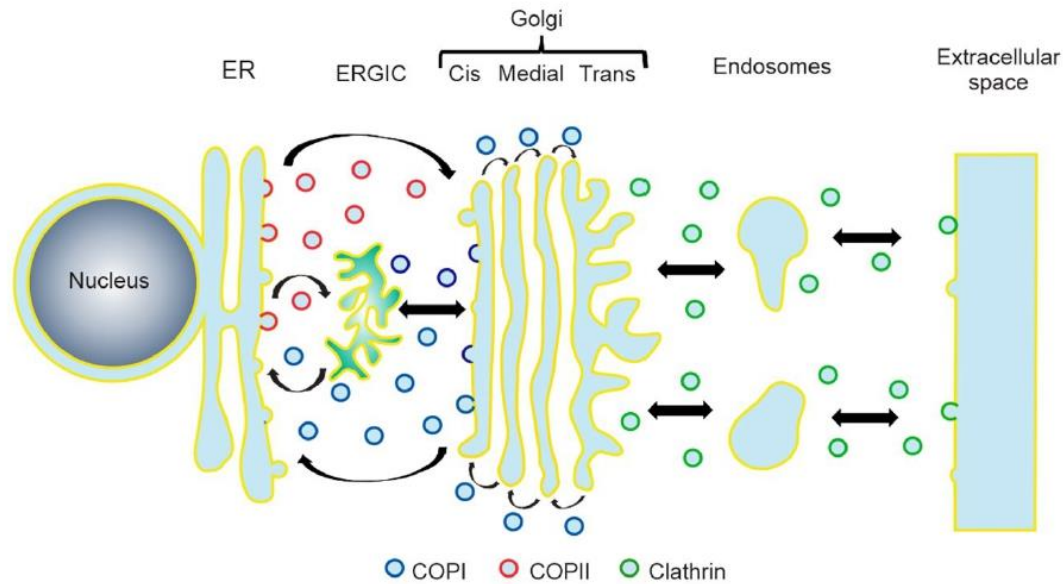


Figure 1. Schematic diagram of the roles of COPI, COPII, and clathrin in the vesicular secretory pathway. ER, endoplasmic reticulum; ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment.

The mechanism of COPI vesicle formation is a complex process regulated by the activation of the small GTPase Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) (Figure 2). This protein belongs to a family of low molecular weight guanine-nucleotide-binding proteins that can be divided into Arf proteins of Class I (Arf1, Arf2, and Arf3), Class II (Arf4 and Arf5) and Class III (Arf6), depending on their sequence identity. Arf proteins cycle between an inactivated cytosolic form, bound to GDP, and an active membrane-associated state, when bound to GTP. Arf proteins are highly conserved and are present in all eukaryotes examined to date, except for Arf2, which has not been reported to be present in humans. These proteins have been shown to play a number of regulatory roles related not only with membrane traffic, but in lipid metabolism, organelle morphology, and cellular signaling [27–29]. Given that Arf1 and Arf3 are the most abundantly expressed Arf isoforms in cells, Class I Arfs have been assumed as the principal actors in vesicle transport. However, in recent years it has been demonstrated that although the different Arf proteins play overlapping and redundant roles in cell transport, specific Arfs display a unique profile of activities to control specific points in the secretory and endocytic pathways. In addition, it has also been observed that in some cases the control of vesicle transport can depend on the cooperation of two particular Arfs [30].

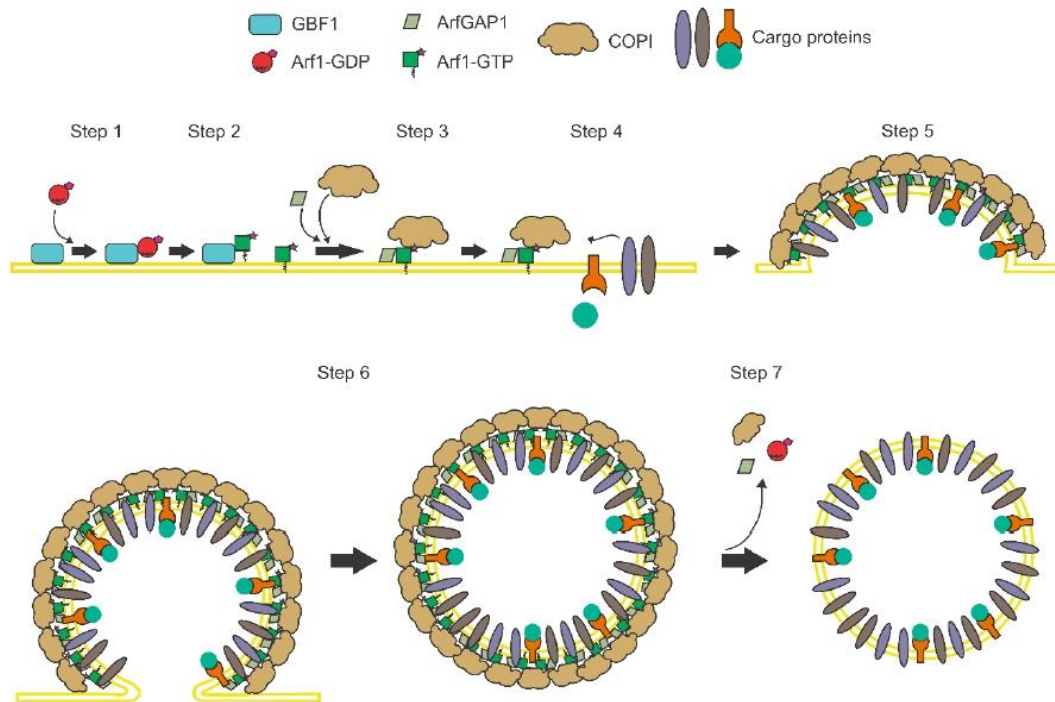


Figure 2. Mechanism of COPI transport. COPI vesicle formation starts when the small GTPase Arf1, bound to GDP (Arf1-GDP), associates with the Golgi-specific Brefeldin A (BFA) resistance factor 1 (GBF1), a guanine nucleotide exchange factor (GEF) that catalyzes the activation of Arf1 by promoting the exchange of GDP for a GTP molecule (step 1). This exchange induces a conformational change in Arf1 that leads to the exposure of a myristoyl group that allows the association of this protein with the membrane [31] (step 2). The membrane-bound Arf1-GTP then promotes the recruitment of the preformed COPI coat formed by seven subunits, called α , β , β' , δ , ϵ , γ and ζ , and the Arf-GTPase-activating protein 1 (ArfGAP1) (step 3). The formation of the Arf1-GTP-COPI-ArfGAP1 complex in the membranes stimulates the binding and concentration of different cargoes (step 4) and induces the bending of the membrane into a vesicle (step 5). Once the vesicle is completed, it buds from the membrane with a coat of COPI (step 6). Finally, the coat proteins are disassembled when the GTPase activity of Arf1 is enhanced by ArfGAP1, leading to the hydrolysis of the GTP molecule, promoting the release of Arf1-GDP, the COPI subunits, and ArfGAP1 from the vesicle to produce the free carrier vesicle used in the vesicular transport (step 7) [32,33].

In addition to Arf proteins, the participation of specific Arf GEFs has also been shown to play an essential role in the regulation of the vesicle transport. For instance, the activation of Arf1 can be driven either by GBF1 to promote COPI transport, or by the Brefeldin A-inhibited GEFs 1 and 2 (BIG1 and BIG2) to initiate clathrin transport; thus, it is thought that Arf1 is committed to each transport pathway depending on the interaction with a specific GEF. In order to achieve this regulation, the different GEFs have been shown to be restrained to particular sites where a specific transport is needed; for example, GBF1 is located at sites where COPI exerts its functions, either in the cis-Golgi cisternae, the ERGIC or the LDs [34,35], whereas BIG1 and BIG2 are located at the trans-Golgi network (TGN), where clathrin works. In this way, each transport pathway depends on the precise temporal and spatial interaction of a specific GEF with a combination of small GTPases.

GBF1 is the GEF that specifically regulates the COPI vesicle transport. Based on its size, GBF1 belongs to the group of large Arf GEFs, which also contains BIG1 and BIG2. This group of GEFs shares a catalytic Sec7 domain that regulates the activation of Arf proteins through binding to the Arf-GDP form, inducing its conformational change, and promoting the exchange of GDP for GTP that leads to the dissociation of the protein from GBF1 [36,37]. Through this mechanism, GBF1 can activate Arf1, Arf4, and Arf5 [38–40]. In addition to its Sec7 domain, GBF1 contains five non-catalytic domains:

the N-terminal dimerization and cyclophilin binding (DCB) domain, the homology upstream of Sec7 (HUS) domain, and three C-terminal downstream of Sec7 (HDS1-3) domains [34,41] (Figure 3). The functions of these non-catalytic domains are not well understood, but given that GBF1 cycles between a soluble and a membrane-bound state, similar to Arf proteins, it has been proposed that these domains are important for the specific interaction of GBF1 with cellular membranes [35,42–44].



Figure 3. Domain organization of GBF1. The positions of the Sec7, DCB, HUS, and HDS1-3 domains are indicated. The amino acid residues comprised in each domain are shown in parentheses.

The multidomain structure of GBF1 allows this protein to engage in numerous interactions with other proteins, leading GBF1 to participate in many different cellular processes and even in the process of infection of some bacteria [45,46]. In addition to its canonical role in vesicular transport, GBF1 has also been shown to participate in the function of LDs and mitochondria, as well as in a clathrin-independent endocytosis pathway and the chemotaxis of migrating neutrophils [34]. Many of these functions have been elucidated through the use of the fungal toxin Brefeldin A (BFA) and the small-molecule Golgicide A (GCA), which inhibit the catalytic activity of this nucleotide exchange factor. These inhibitors bind to the protein–protein interface in the complex formed by the Sec7 domain of GBF1 and Arf-GDP, and block the conformational changes of Arf proteins that allow the exchange of GDP for GTP [36]. This inhibition leads to the release of COPI from the membranes with the consequent inhibition of the vesicle transport, and also primes the disassembly of the cisternae of the Golgi apparatus. Moreover, it has also been observed that BFA and GCA induce the swelling of the ER compartment, likely due to the fusion of the cis-Golgi with the ER. Both BFA and GCA share many similarities in their effects; however, while BFA has been shown to inhibit the activity of GBF1, BIG1, and BIG2 GEFs, GCA does not affect other GEFs as it is a specific inhibitor of GBF1 [15,32,33,47]. These inhibitors have been useful tools for understanding the participation of GBF1 in different cellular functions. Moreover, in recent years, the use of these drugs has unveiled the essential role that GBF1 plays in the replication of several RNA viruses that belong to different families (Table 1), strongly suggesting that GBF1 can exhibit diverse functions that go beyond its role in vesicle transport. In this review, we explore the current knowledge of the role GBF1 plays in the replication of RNA viruses and present an overview of the different viral functions that depend on the activity of this factor.

Table 1. Role of GBF1 in the replication of RNA viruses.

Type of genome	Family	Virus	Viral replication step that requires the GBF1 activity	Reference
Non-segmented (+)ssRNA	Flaviviridae	DENV	RNA replication Virus assembly	[48,49]
		TBEV	Virus assembly	[50]
		YFV	Virus secretion	[51]
		KUN	Formation of viral replication complexes	[52]
		CSFV	RNA replication	[53]
		HCV	RNA replication Protein expression Virus secretion	[54–56]
	Picornaviridae	Poliovirus	RNA replication	[57–59]
		CVA21	RNA replication	[60]
		CVB3	RNA replication	[60–62]
		CVB4	RNA replication	[51]
		EV71	RNA replication Protein expression	[60,63,64]
		HRV2	RNA replication	[65]
		HRV14	RNA replication	[65]
	Togaviridae	CHIKV	RNA replication Early protein expression	[66]
		SINV	RNA replication Protein expression	[51,67]
	Hepeviridae	HEV	RNA replication	[68]
		MHV	RNA replication	[69]
	Coronaviridae	SARS-CoV	RNA replication RNA transcription	[70,71]
		HCoV-229E	RNA replication	[51]
Non-segmented (-)ssRNA	Rhabdoviridae	VSV	RNA replication RNA transcription Protein expression	[72]
	Paramyxoviridae	HPIV3	Protein expression	[72]
Segmented (-)ssRNA	Orthomyxoviridae	IAV	Virus assembly	[73–75]
	Arenaviridae	LCMV	Protein expression	[72]
Segmented dsRNA	Reoviridae	Rotavirus	Virus assembly	[76]

DENV, dengue virus; TBEV, tick-borne encephalitis virus; YFV, yellow fever virus; KUN, Kunjin virus; CSFV, classic swine fever virus; HCV, hepatitis C virus; CVA21, coxsackievirus A21; CVB3, coxsackievirus B3; CVB4, coxsackievirus B4; EV71, enterovirus 71; HRV2, human rhinovirus 2; HRV14, human rhinovirus 14; CHIKV, chikungunya virus; SINV, Sindbis virus; HEV, hepatitis E virus; MHV, mouse hepatitis coronavirus; SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome coronavirus; HCoV-229E, human coronavirus 229E; VSV, vesicular stomatitis virus; HPIV3, human parainfluenza virus 3; IAV, influenza virus; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus.

2. Positive-Sense RNA Viruses

2.1. Family Flaviviridae

2.1.1. Flavivirus

Flaviviruses are enveloped, positive-sense, single-stranded RNA viruses with a genome of approximately 9.4–13 kb in length. The genome is organized as a long open reading frame (ORF) encoding a polyprotein that is cleaved into three structural (C, prM, and E) and seven nonstructural

(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) proteins. During infection, flaviviruses induce a profound rearrangement of cellular membranes to provide platforms for viral replication. It has been observed that RNA replication occurs in vesicular structures called vesicle packets derived from membranes of the ER [77]. Although the assembly process of flaviviruses is unclear, it has been suggested that during RNA replication, the viral capsid protein (C protein), located on the surface of LDs, recruits the viral genome for formation of the nucleocapsid [78]. The newly formed nucleocapsid then buds into the ER lumen, acquiring during this process the structural glycoproteins E and prM, as well as the membrane envelope. Finally, as the novel viral particle travels through the secretory pathway to be released by exocytosis, the virus experiments a maturation process in which the prM protein is cleaved by the furin protease to yield the mature M protein [77].

In recent years, increasing evidences have shown that GBF1 is an important cellular factor involved in the replication of several flaviviruses, including dengue virus (DENV) [49,78–80], yellow fever virus (YFV) [51], tick-borne encephalitis virus (TBEV) [50], and Kunjin virus (KUN) [52]. In the case of DENV, it was shown that BFA and GCA reduce the abundance of viral RNA, and depletion of GBF1 was sufficient to cause this reduction and to inhibit the viral production [49,79]. Also, BFA has been shown to retard the mortality of mice infected with DENV, but not to alter the final mortality outcome [81]. In support of the participation of GBF1 in the DENV lifecycle, it was found that the viral RNA decrease induced by GCA could be reverted by overexpression of either wild-type GBF1 (GBF1-Wt) or a drug resistant GBF1 mutant [47,79]. The mechanism through which GBF1 favors the replication of DENV RNA is unknown; however, the fact that this factor directly interacts with the NS5 protein, the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of DENV, suggests that GBF1 might be directly involved in the RNA replication process through regulation of the activity of NS5 [79]; alternatively, it has also been proposed that GBF1 might modulate the replication of viral RNA by participating in the biogenesis of the viral vesicle packets [79]. In support of this latter idea, it has been reported that BFA can prevent the membrane rearrangement induced by KUN, when the drug is added at early times of infection [52]. Altogether, these findings suggest that GBF1 might engage the nascent replication complexes of flavivirus (vesicle packets) through its interaction with NS5; once in these sites, GBF1 could regulate the formation of these viral organelles through the activation of Arf proteins and the recruitment of cellular effectors that ultimately could lead to the creation of a microenvironment that allows the proper activity of NS5.

In addition to the role of GBF1 in RNA replication, it has been reported that depletion of this factor or its pharmacological inhibition with BFA could also affect the DENV assembly by blocking the accumulation of the C protein into the LDs, which depends on the catalytic activity of GBF1 [48]. Moreover, considering that depletion of other elements involved in COPI transport, such as the COP- β subunit or the simultaneous depletion of Arf1 and Arf4, largely reduce the accumulation of the C protein in LDs, it was suggested that the dynamic delivery of the C protein from ER to LDs is regulated by the COPI complex through the GBF1-mediated activation of Arf1 and Arf4. On the other hand, and similar to DENV, in TBEV-infected cells, the inhibition of GBF1 also showed an alteration in the transport of the structural prM, E, and C proteins [50].

Of interest, the increment of the C protein transport and the inhibition of viral progeny production has also been recapitulated by treating TBEV-infected cells with interferon 1 (INF1), through the induction of the expression of the viperin (virus inhibitory protein, ER-associated, IFN-inducible) protein [50]; viperin also has antiviral effects on other flaviviruses such as DENV [82] and West Nile virus (WNV) [83]. The antiviral activity of viperin seems to be the result of the inhibition of the GBF1 activity, since overexpression of this factor was shown to counteract the effects of viperin on the TBEV infection [50].

On the other hand, it has been shown that the simultaneous depletion of Arf4 and Arf5 decreases the secretion of DENV and YFV particles, without affecting the constitutive secretory pathway [80]. The fact that these Arf proteins can be selectively activated by GBF1, and that the block in the secretion of DENV particles can be replicated by treatment of cells with BFA, suggest that the secretion of DENV particles to the extracellular medium is GBF1-mediated and is dependent on the

activation of Arf4 and Arf5. However, this requirement is not shared by all flaviviruses since the replication of WNV is not affected by depletion of these Arfs [80].

2.1.2. Pestivirus

Although many aspects of the pestiviruses replication cycle remain unknown, a recent study described that replication of the classical swine fever virus (CSFV) depends on the activity of GBF1. It was described that both BFA or GCA are able to reduce the viral titers and the viral RNA level, and depletion of GBF1 is sufficient to cause this effect [53]. It seems that GBF1 could facilitate pestiviruses replication by regulating the COPI-mediated transport, since knocking down the expression of Rab2, a regulatory element of the retrograde transport mediated by COPI [84], has been shown to significantly decrease the viral titer and the RNA level of CSFV. Of interest, this transport does not seem to rely on the activation of Arf1, since depletion of this factor did not affect CSFV replication [53]. The replication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), the prototype member of the *Pestivirus* genus, was also demonstrated to be strongly inhibited in the presence of BFA [54], suggesting that the dependence on GBF1 could be a feature shared among different pestiviruses.

2.1.3. Hepacivirus

Infection by hepatitis C virus (HCV), the only member of the *Hepacivirus* genus, induces an extensive remodeling of intracellular membranes to produce a membranous web composed of ER membranes, LDs, and double-membrane vesicles containing HCV nonstructural proteins (NS3, NS4A-B, NS5A-B) as well as the HCV RNA [85,86]. Although the biogenesis of this membranous web is not well understood, the NS4B and NS5A proteins appear to play a major role in the induction of membrane rearrangements [87,88]. Once the web is formed, the NS5B protein (RdRp) directs the replication of the viral positive-sense RNA genome. Detailed knowledge about the individual steps of HCV particles assembly is lacking; however, it is generally assumed that nucleocapsid formation and budding are spatially and temporally linked events occurring in an ER-derived compartment [85,86,89]. In this regard, it has been reported that GBF1 facilitates multiple steps of HCV infection, including the replication of viral RNA [54,55]. A decrement in the levels of GBF1 was found to diminish the expression of NS5A, a multifunctional protein that modulates the viral polymerase NS5B; however, most of the effect on virus replication seems to be related to the role of GBF1 in the formation and function of the membranous web where the replication complexes of HCV assemble [54]. GBF1 inhibition neither disrupts the preformed membranous webs of HCV nor blocks the formation of novel membranous web structures, but it rather affects the maturation of these viral organelles, which exhibit a smaller and less organized structure during the inhibition of this factor [54,55]. In this regard, it was reported that the inhibition of GBF1 induces a change in the intracellular localization of NS5A and NS3 (viral protease) from their usual location in the replication complexes to the rims of LDs [90], suggesting that GBF1 could mediate the transport of non-structural viral proteins and perhaps cellular proteins to these sites. In support of this possibility, it has been found that while a BFA-resistant GBF1 mutant could revert the effects of BFA on HCV, an inactive mutant or a truncated form of GBF1 lacking the catalytic Sec7 domain were unable to maintain the replication of HCV in the presence of BFA [54,91]; this suggests that the role of GBF1 depends on its capacity to activate Arf proteins. However, in a contrasting observation, the expression of NS5A was reported to downregulate the activation of Arf1 [90].

Arf1 activation has also been shown to be related with the viral assembly of HCV through modulation of the recruitment of the adipose differentiation-related protein (ADRP) to LDs. ADRP, a member of the perilipin family, is a major protein associated with LDs in various cell types. This protein has been proposed to play a positive role for HCV RNA replication while performing a negative function for HCV assembly [92]. Although the role of this protein in RNA replication is unknown, it has been observed that ADRP shields the recruitment of the HCV core protein into LDs, a step essential for virus morphogenesis [92,93]. In addition, the association of ADRP with LDs has been shown to be dependent on the activation state of Arf1. Altogether, these results suggest that during HCV infection the activation of Arf1 induced by GBF1 promotes the exportation of NS5A and

NS3 from the LDs to the sites where replication complexes are located, to favor the replication of the viral RNA and, at the same time, induces the release of ADRP from LDs to favor the morphogenesis of the virus particles. Since BFA treatment has also been shown to inhibit the secretion of HCV viral particles, leading to their progressive intracellular accumulation within the ER [94], it seems that GBF1 is important for both the assembly and exit of the newly formed HCV virions.

Similar to Arf1, the simultaneous depletion of Arf4 and Arf5, in which the activation also depends on GBF1, has been reported to reduce the RNA replication of HCV probably through affecting the morphology of LD but not the secretion pathway [51,91]. Altogether, these results suggest that the role of GBF1 is not restricted to maintain a single type of transport but rather to coordinate different transport pathways that promote the infection of HCV. Moreover, they also indicate that the role of GBF1 in the LD transport, but not in the secretory pathway, is important for HCV infection. In agreement, several works have reported that HCV replication can be completely inhibited at BFA concentrations that do not affect the secretion of proteins [54,55,95].

In addition to the role of GBF1 in the transport of cellular and viral proteins relevant for RNA replication and viral assembly, it has also been observed that this factor can regulate the lipid composition of the membranous web induced by HCV. Inhibition of GBF1 activity and Arf1 activation abolishes the accumulation of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) in the membranes of the HCV replication complexes [96], a process that has been shown to promote the replication of the viral RNA. Although it is not clear how GBF1 and Arf1 prompt the accumulation of PI4P, recent findings suggest that these factors might induce the transport to the HCV replication sites of the type III phosphatidylinositol 4-kinases α (PI4KIII α) and β (PI4KIII β) enzymes, which are responsible in the Golgi apparatus for the generation of PI4P. Although the precise role of PI4P in HCV replication remains unknown, it has been proposed that these lipids might be important to generate membranes sites that permit the association of proteins to the replication complex of HCV, but it could also impact the organization and kinetics of the transport pathways modulated by HCV [56,62,97].

In a mechanism apparently different from the regulation of protein traffic, it has been found that GBF1 might also modulate the processing of the HCV polyprotein by regulating the protease activity of the NS3-NS4A complex; this regulation process requires the interaction between the Sec7 domain of GBF1 and the protease domain of NS3. Moreover, the protease activity of the NS3-NS4A complex has been shown to depend on the catalytic activity of GBF1 [98].

2.2. Family Picornaviridae

Enterovirus

The genus *Enterovirus* (EV) includes a collection of small non-enveloped viruses with a small positive-sense single-stranded RNA genome. These viruses have been classified into 15 serologically distinct groups, comprising 12 groups of enterovirus (EV-A to L), and three groups of rhinovirus (RV) (RV-A to C). The replication cycle of EV starts with the attachment of the virus to specific cell host receptors. After virus internalization, the viral genome is released into the cytoplasm to direct the synthesis of a single polyprotein, which is auto-processed by viral proteases 2A and 3C to produce three structural proteins (VP0, VP1, and VP3) and seven nonstructural proteins (2A–2C and 3A–3D), as well as some stable protein precursors (2BC, 3AB, and 3CD) that can also participate in the replication cycle. As the infection progresses, EV promotes the creation of viral cytoplasmic replication complexes formed by clusters of tightly associated vesicles of heterogeneous size, where the viral RdRp 3D protein directs the replication of the genomic RNA. The novel genomic RNA then is either translated or packaged into preassembled procapsids (composed of VP0, VP1, and VP3). Finally, the newly EV procapsids are secreted into the extracellular medium through a process in which VP0 is cleaved into VP2 and VP4, to form the mature, infectious virus particles.

Although many of the details of the EV replication cycle have been described, the role of host factors in the replication complexes of EV are less characterized. One of the most intriguing features of EV replication is the participation of the cellular secretory pathway in the infectious process. The inhibition of this pathway by BFA and GCA revealed that the RNA replication of many members of

EV genus, such as poliovirus, CVB3, coxsackievirus B4 (CVB4, member of EV-B group), coxsackievirus A21 (CVA21, member of EV-C group), enterovirus 71 (EV71, member of EV-A group), echovirus 11 (E11, member of EV-B group), and bovine enterovirus type 2 (BEV2, member of EV-F group) are sensitive to these drugs [51,60,61,64,99–103]. Furthermore, the replication of human rhinovirus 2 (HRV2, member of RV-A group) as well as human rhinovirus 14 (HRV14, member of RV-B group) was also inhibited by BFA and GCA [65]. The reason for this blockage is unknown, although it has been reported that these inhibitors do not alter the formation of the replication complexes of EV, but rather inhibit the proper functioning of these viral organelles, which are unable to support the viral RNA synthesis [58]. Also, it has been shown that the blockage of RNA replication produced by BFA and GCA is related to the activity of GBF1 since the overexpression of GBF1 prevents the effects of these drugs on EV replication [58,61,64,65]. Moreover, GBF1 knockdown confirms that the reduction of this factor reduces the EV RNA replication [58,61–64,104]. Although the precise role of GBF1 in EV replication is unknown, further analysis of poliovirus, CVB3, and EV71 infection revealed that the N-terminal region of GBF1 interacts with the viral 3A protein; this interaction, in turn, stimulates the association of GBF1 with the membranes where the EV replication complexes are located [58,59,64,105–108], inducing ultimately a steady increase in the activation of Arf1, Arf3, and Arf5 [64,104,109].

Although it is generally accepted that GBF1 interacts with the 3A protein, the importance of this interaction for the replication of the EV RNA remains to be elucidated. The use of different GBF1 mutants revealed that mutations in this protein that abolish the interaction with 3A reduce the ability of this cellular factor to support EV RNA replication [58,59]. However, it has also been found that an EV mutant strain with a 3A protein incapable of interacting with GBF1 replicates to a similar extent as the wild type virus does [58,105,108], suggesting that the interaction GBF1-3A is dispensable for the EV replication. In this regard, it has also been found that even though GBF1 can be recruited to the replication complexes formed by HRV2 and HRV14, the 3A protein of HRV14 only shows a slight interaction with GBF1, whereas the 3A protein of HRV2 did not interact at all [65,107], indicating that the recruitment of GBF1 to the replication complexes of EV is not dependent on its interaction with 3A. Reconciling these findings is complicated; however, it is possible that mutations in GBF1 that alter its interaction with 3A might also abolish the ability of GBF1 to interact with other cellular factors needed for the proper function of this GEF in the RNA replication of EV, an effect that is not observed when the 3A protein is mutated. Furthermore, taking into account that the expression of 3A can inhibit selectively some steps of the secretory pathway [105,106,110] and that overexpression of GBF1 has been shown to counteract these effects [105], it seems that the interaction of 3A with GBF1 is essential to block the secretory pathway, rather than to participate in the replication of EV. Therefore, it is possible that 3A functions as a competitive inhibitor that binds GBF1 in order to hinder its activity in the secretory pathway.

The relevance of the Arf activation in the replication cycle of EV is also unclear. The depletion of Arf proteins has been shown to reduce the replication of EV71, CVB4, and CVB3 [51,62,64], indicating that these factors are important for EV replication. However, the expression of a truncated mutant composed of the N-terminal DCB and HUS domains of GBF1, but lacking the Sec7 domain, has been shown to be sufficient for the rescue of poliovirus and CVB3 RNA replication in the presence of BFA [59,61]. Thus, it has been proposed that although GBF1 is essential for EV replication, the increment of Arf activation detected during infection of some members of EV genus might be a side effect produced by the increased association of GBF1 with membranes [111]. These results led to propose that the N-terminus of GBF1 might play an essential role in RNA replication by stimulating the recruitment of cellular factors that are essential for the function of the replication complexes of EV; however, the identity of these effectors remains to be elucidated. Recent findings have shown that poliovirus triggers the lipid membrane synthesis of replication complexes by mobilizing the neutral lipids stored in LDs, in an adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) dependent fashion [112]. These observations, together with described functions of GBF1 in LDs morphology, and its role in prompting the transport of ATGL to LDs [42,113], seem to indicate that GBF1 might support the function of EV replication complexes through regulating the lipid flux from

LDs. In this regard, it has been observed that BFA inhibits the increment of lipid synthesis induced by poliovirus infection [99].

In contrast to the strong evidence regarding the relevance of GBF1 for the replication of several enteroviruses, this dependency is not a common feature shared by all members of the *Picornaviridae* family. Encephalomyocarditis virus (EMCV, member of the *Cardiovirus* genus), the foot-and-mouth disease virus (FMDV, member of the *Aphthovirus* genus), as well as the Aichi virus (AiV, member of *Kobuvirus* genus) have been shown to be resistant to the effects of BFA, indicating that GBF1 is not involved in their replication cycle [102,103,114,115]. On the other hand, the dependency on GBF1 does not seem to be limited to the EV genus, since the replication of parechovirus 1 (ParV1, member of the *Parechovirus* genus) is partially sensitive to BFA [102].

2.3. Family *Togaviridae*

Alphavirus

This genus includes a large number of mosquito-borne viruses that can infect mammals, birds, fish, reptiles, and amphibians. Alphaviruses consist of enveloped viral particles that contain a single-stranded positive-sense RNA genome that encodes two ORFs. The first ORF directs the synthesis of four non-structural proteins (nsP1-4), whereas the second ORF codes for the structural capsid protein (CP) and two surface envelope glycoproteins (E1 and E2) [116]. Once in the cytoplasm, the viral genome is translated to produce a single polyprotein formed by the four nonstructural proteins. The auto-proteolytic processing of this polyprotein renders the individual nsP1-4 proteins that assemble to form a replicase complex. The replicase complex, together with the genomic RNA and host proteins, then assemble at the plasma membrane to form viral replication compartments called spherules that direct the replication and transcription of the viral RNA. Furthermore, as the infection progresses, the internalization of the spherules from the plasma membrane has been shown to create large cytopathic type 1 vacuoles (CPV-1) that can also direct the replication and transcription of viral RNA. Either from spherules or CPV-1, a subgenomic RNA is transcribed from the second ORF to produce a single polyprotein composed of the structural proteins CP, E2, and E1. The auto proteolysis of this polyprotein releases CP in the cytosol and permits the translocation of E1 and E2 into the ER, where they are post translationally modified to yield the final glycoproteins that are then transported by the exocytic pathway to the plasma membrane. Concomitant with these processes, the formation of new icosahedral nucleocapsids occurs in the replication complexes that associate to plasma membrane sites decorated with E2/E1 and then bud to the extracellular medium, producing the mature enveloped particles. [116,117].

Given the involvement of the secretory pathway in the proper processing and transport of E1/E2 to the plasma membrane, this transport has been thought to be important only for virus particle maturation. However, in recent years it was found that the inhibition of protein transport by BFA or GCA could disturb the RNA replication and protein synthesis of Sindbis virus (SINV) [51,67], the prototype member of this genus, as well as of chikungunya virus (CHIKV) [66]. This alteration was found to be associated with a post entry virus replication step that depends on the activity of GBF1, since depletion of this factor was sufficient to reduce the viral RNA replication [66]. Given that alphavirus replication has been shown to induce the formation of membrane vesicles in order to create the viral replication complexes (spherules and CPV-1) that direct the synthesis of the viral RNA, these results led to propose that the function of GBF1 could be to facilitate the efficient replication of the alphavirus RNA genome by promoting the formation of the membrane vesicles required for this process [67]. In support of this model, it has been found that the alphavirus RNA replication depends on the presence of Arf1, Arf3, Arf4, and Arf5 [51,66], as well as on a functional COPI complex [66]. Thus, these results indicate that GBF1 might induce the formation of membrane vesicles through the activation of the COPI transport mediated by different Arf proteins. In agreement with the importance of GBF1 early in infection, it was found that the inhibitory effect of BFA on the replication SINV is lost when this drug is added at late times post infection. Moreover, these data also suggest that the activity of GBF1 is dispensable for the function of the alphavirus

replication complexes since BFA does not affect the replication of the viral RNA once these organelles are formed [67,118].

On the other hand, taking into account that Arf4 and Arf5 participate in maintaining the LD morphology, but are not important for protein transport [91], the involvement of these Arf proteins in alphavirus RNA replication might suggest that GBF1 and COPI could also participate in the viral RNA replication through the function of LDs. Although the possible relation between LDs and alphavirus replication has never been tested in mammalian cells, the finding that SINV infection induces the accumulation of LDs in mosquito Aag2 cells as well as in the midgut of *Aedes aegypti* females [119] seems to support the idea that alphavirus might rely on LDs for its replication.

2.4. Family *Hepeviridae*

The family *Hepeviridae* englobes a group of hepatitis E viruses (HEV) that are non-enveloped and contain a positive-sense single-stranded RNA genome that contains two ORFs. The first ORF encodes a non-structural polyprotein (ORF1 protein) that exhibits several functions, such as methyltransferase, protease, RNA helicase, and RdRp, while the second ORF codes for the capsid protein (CP). Due to the low efficiency of these viruses to grow in cell culture, their replication process is poorly understood, although it has been proposed that it might be similar to that of togaviruses [120]. In fact, a recent report revealed that similar to viruses in the *Togaviridae* family, the RNA replication of HEV was sensitive to treatments with BFA and GCA, and that GBF1 plays an essential role in this process although, unlike togaviruses, the inhibition of GBF1 activity by BFA does not affect the formation of the HEV replication complexes.

2.5. Family *Coronaviridae*

Coronavirus

The members of this genus are enveloped viruses that contain a large positive-sense, single-stranded RNA genome with several ORFs that direct the synthesis of 16 nonstructural proteins (nsp1 to nsp16), four structural proteins (S, M, E, and N) and, in some viruses, a group of up to eight accessory proteins that are key for the efficient replication of the virus in natural conditions [121]. Once released in the cytoplasm, the viral RNA directs the synthesis of the nonstructural proteins that form the RdRp complex, which transcribes the full-length, negative-sense antigenomic RNA. The coronavirus antigenome is then used for the production of the full-length genomic RNA copies and a set of subgenomic mRNAs of different lengths that direct the synthesis of the structural and accessory proteins. Following their synthesis, the structural proteins S, E, and M are inserted into the ER and then transported along the secretory pathway up to the ERGIC, where the nucleocapsid, formed by the new RNA genome bound to N proteins, buds to form the mature virions. Following assembly, virions are finally released to the extracellular medium by exocytosis. During coronavirus infection, all RNA synthesis processes occur in a replication–transcription complex (RTC), composed of viral and host proteins that are associated to a reticulo-vesicular network (RVN) made of modified intracellular membranes and double-membrane vesicles (DMVs) apparently derived from the ER [121,122].

Recent evidence has indicated that the secretory pathway participates in the formation and function of both RTC and RVN. It has been reported that the inhibition of the secretory pathway by BFA or GCA strongly reduces the RNA replication of different coronavirus strains such as the human coronavirus 229E (HCoV-229E, alphacoronavirus), the mouse hepatitis coronavirus (MHV, betacoronavirus), and the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV, betacoronavirus) [51,69,70]. These effects were shown to be related with the specific inhibition of the activity of GBF1 [69,71]. The precise role of GBF1 in coronavirus RNA replication is not clear; however, given that the inhibition of this factor by BFA does not alter the RNA-synthesizing activity of RTCs, but rather decreases the number of these organelles, as well as the number of DMVs in MHV- and SARS-CoV-infected cells, it has been proposed that the GBF1 activity might be required for the formation of the virus-induced RVN [69,70]. Altogether, coronavirus infection seems to

redirect the vesicle transport mediated by GBF1 toward the RTCs to maintain the correct morphology of these viral organelles. In support of this proposal, the silencing of Arf proteins or subunits of the COPI complex has shown to induce a similar inhibitory effect on MHV and HCoV-229E replication, similar to that observed with the GBF1 depletion [51,71].

On the other hand, the finding that overexpression of the dominant-negative mutant Arf1-T31N strongly inhibits MHV replication [69], together with the fact that this Arf mutant has been shown to inhibit the ERGIC to ER transport [123], lead to suggest that GBF1 might regulate the maturation of RVN through the retrograde vesicular transport of membrane lipids from the ERGIC to the ER [69].

3. Negative-Sense RNA Viruses

3.1. Family Rhabdoviridae

Vesiculovirus

The *Vesiculovirus* genus comprises a distinct monophyletic group of enveloped bullet-shaped viruses that contain a negative-sense, single-stranded RNA genome that codes for five structural proteins: the nucleocapsid protein (N), the phosphoprotein (P), the matrix protein (M), the glycoprotein (G), and the RdRp (L). After virus entry into the cell, the viral nucleocapsid is released into the cytoplasm. Once free, the virion polymerase complex, composed by the N, P, and L proteins drives the transcription of the viral mRNAs, which then direct the synthesis of the different viral proteins. Once sufficient quantities of the N and P protein have been produced, the virion polymerase complex starts the synthesis of a full-length complementary antigenome RNA of positive sense. The antigenome then serves as a template to synthesize new viral negative-sense genome molecules, which can be used for a second round of transcription or can be assembled into new viral particles. The union of the N protein to the newly genomic RNA compromises these molecules to the formation of helical nucleocapsids that interact with the M protein and are transported to cell membrane sites enriched by the spike G glycoprotein. Budding of the nucleocapsid through these sites leads to the formation of the final enveloped virus [124].

Given that the transport of the G protein to the cell membrane depends on a functional secretory pathway, the vesicular transport was thought to only play a role in the final steps of vesiculovirus replication. However, studies with the vesicular stomatitis virus (VSV), the prototypic member of this genus, revealed that this transport was also important for the synthesis of the viral RNA. It was observed that BFA or GCA treatments induce a substantial reduction in the levels of viral mRNA, and the antigenome RNA of VSV [72,125,126]. The action of these inhibitors was shown to be related to the GBF1 protein [72,125]. Although the exact role of GBF1 in RNA synthesis is unknown, taking into account that the depletion of Arf1 or the overexpression of the dominant-negative mutant Arf1-T31N decrease the abundance of viral RNA products and reduce the VSV gene expression [72], it seems that the role of GBF1 in the process might be related to vesicle transport.

On the other hand, a structure-based computational analysis of possible protein–protein interactions between human proteins and the proteins of Chandipura virus (CHPV), another member of the *Vesiculovirus* genus, which has emerged as a pediatric encephalitic virus in India [127,128], revealed that GBF1 and Arf1 exhibit a high potential for interaction with the G and L proteins of this virus [129]. Although the association of GBF1 and Arf1 with the G protein was rather expected, given the association of the G protein with the secretory pathway, the potential interaction of GBF1 and Arf1 with the polymerase L of CHPV is a surprising finding that might indicate that GBF1 could directly regulate the activity of the L protein during viral RNA replication; the interaction between GBF1 and the L protein was not corroborated by biochemical assays.

On the other hand, considering that the microtubule-dependent transport of viral mRNAs from the VSV inclusions to the cytoplasm has been proved to be essential for their efficient translation [130], it might also be possible that GBF1 promotes the protein expression of vesiculoviruses by facilitating the transport of viral mRNAs out of the inclusions through the activation of Arf1 and the subsequent recruitment of COPI elements. In support of this model, it has been reported that VSV

infection can be inhibited by microinjection of an antibody against COP- β that blocks the transport between the ER and Golgi [131].

3.2. Family Orthomyxoviridae

3.2.1. Influenza Virus

Influenza viruses are enveloped viruses that contain a segmented negative-sense, single-stranded RNA genome that can be formed by seven or eight RNA segments, depending on the virus strain. The genome of these viruses codes for three proteins that form the viral RdRp (PA, PB1, PB2), a nucleoprotein (NP) that is associated with each genome segment, a hemagglutinin (HA) protein that facilitates virus attachment, and the matrix protein 1 (M1) that acts as an adaptor protein between the viral ribonucleoproteins (RNPs) and the membrane envelope. Moreover, some members also code for a neuraminidase (NA) that contains sialidase activity essential for the releasing of the mature viral particles, and a small integral membrane matrix protein 2 (M2), a proton selective ion channel. In addition to structural proteins, these viruses may also code for two nonstructural proteins (NS1, NS2). After cell entry, the RNPs are released into the cytoplasm; once free, the RNPs are then imported to the cell nucleus, where the viral RdRp synthesizes the mRNAs that direct the synthesis of the viral proteins in the cytoplasm of the cell. During their synthesis, the proteins HA, NA, and M2 are inserted into the ER membrane, and are transported to the sites of viral assembly in the plasma membrane. Concomitant with this process, the NP, PA, PB1, and PB2 proteins are imported into the nucleus and bind the newly synthesized RNA genome segments to form the novel RNPs that are then exported to the cytoplasm and subsequently transported to the sites of viral assembly in the plasma membrane. Finally, the budding of RNPs in the enriched HA, NA, and M2 membrane sites produces the new influenza virus infectious particles [132,133].

Two models have been proposed to explain the RNP traffic to the plasma membrane, and in both cases the interaction of the RNPs with Rab11 is involved [134,135] [136]. Recently, it was also reported that, in addition to Rab11, the activity of GBF1 was important for the assembly process of influenza A virus (IAV) [73,74,137]. The block on IAV assembly was found to be related with a decrement on the cell surface of the HA, NA, and M2 viral proteins, as well as with disruption of the transport of RNPs to the plasma membrane [73–75,137], indicating that GBF1 facilitates the assembly of IAV by regulating the transport to the plasma membrane of the viral elements that form the IAV virion.

Besides its role in regulating the transport of viral proteins to the plasma membrane, it has been shown that GBF1 interacts specifically with the protein M2 [74]. Although the biological importance of this interaction is unknown, the observation that IAV induces the disruption of the Golgi apparatus [75] makes it possible that through the M2-GBF1 interaction the GBF1 is hijacked from the secretory pathway (as observed for the 3A protein of picornavirus), to promote the transport of HA, NA, M2 proteins, and the RNPs. Moreover, the observation that the inhibition of RNP transport by BFA induces the accumulation of RNPs in tubulated structures in the perinuclear region [137], suggest that M2 might recruit GBF1 from the Golgi apparatus to the tubulate ER network to promote the transport of HA, NA, M2, and RNPs to the plasma membrane. In support of the role of GBF1 to stimulate the transport of these viral elements, it has been found that Arf1 can colocalize with RNPs of IAV [75], suggesting that GBF1 might mediate the traffic of IAV RNPs by maintaining an active COPI transport. In support of this idea is the discovery that RNPs travel to the plasma membrane in a microtubule dependent fashion [134,135], as well as the close relationship between the movement of COPI vesicles and microtubules, which seem to indicate that COPI vesicles might be important to the transport of RNPs. In addition, COPI was also suggested to be related with the internalization process of IAV, since its depletion was shown to reduce this process [73,138]. However, given that these results could not be recapitulated by BFA and GCA treatments, it was presumed that this effect might be due to the long-term inhibition of protein and lipid transport to the plasma membrane [73]. The evaluation of the effects of RNAi depletion of COPI on IAV replication assays that bypass the virus internalization process would help to bring light into this controversial matter.

3.2.2. Other Negative-Sense RNA Viruses

The participation of GBF1 in the replication of negative-sense RNA viruses is not restricted to IAV. The replication of human parainfluenza virus type 3 (HPIV3, member of *Paramyxoviridae* family), as well as that of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV, the prototypic member of the *Arenaviridae* family) have also shown to be dependent on the GBF1 activity. Depletion of this factor by RNAi or its pharmacological inhibition by BFA or GCA, has shown to significantly reduce the protein synthesis of these viruses [72]. However, whether the role of GBF1 might be related directly to viral protein synthesis or results from defects in the previous steps of the viral cycle, remains to be elucidated. On the other hand, although HPIV3 and LCMV were shown to depend on GBF1, the finding that Arf1 depletion reduces the LCMV protein expression, but does not affect that of HPIV3, suggests that the role of GBF1 in LCMV could be related to the COPI transport, whereas for HPIV3 GBF1 might play an alternative function independent of vesicle transport, although the possibility that HPIV3 could depend on other Arfs cannot be ruled out.

4. Double-Stranded RNA Viruses

Family *Reoviridae*

Rotavirus

Rotaviruses are non-enveloped viruses formed by three concentric layers of proteins that surround a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) that code for six nonstructural (NSP1-6) and six structural (VP1-4, VP6, and VP7) proteins. The inner core of rotavirus is composed by the protein VP2, which encloses the replication machinery formed by the dsRNA segments, the RdRp VP1, and the protein VP3. The intermediate layer, formed by VP6, surrounds the viral cores to form double-layered particles (DLPs). Finally, the addition of the glycoprotein VP7 and the spike protein VP4 onto the DLPs forms the infectious triple-layered particles (TLPs). The replication of rotavirus occurs in cytoplasmic non-membranous electron-dense inclusions termed viroplasm. Replication and packaging of the viral genome into newly synthesized DLPs take place in these inclusions. The novel DLPs then bud into the lumen of ER through membrane sites modified by the presence of NSP4 and VP7, acquiring a transitory lipid envelope bearing the NSP4, VP7, and VP4 proteins. As the new DLPs move into the lumen of the ER, the transient lipid envelope is removed by an unknown process in which NSP4 is eliminated while VP4 and VP7 are assembled to produce the final infectious TLPs[139].

Although many of the steps of rotavirus replication have been elucidated in recent years, the precise mechanism of the final events of rotavirus assembly is not well understood. It is known that NSP4 (a transmembrane ER glycoprotein) plays a crucial role in the last steps of rotavirus assembly. The interaction of NSP4 with VP4 and VP7 [140], together with the binding of NSP4 to the VP6 protein on the surface of DLPs, has been proposed to drive the incorporation of the outer layer proteins to form the final TLPs. However, whether specific cellular pathways or cell proteins are involved in the assembly process remains unknown.

In recent years, the use of genome-wide RNAi screens has shown that the vesicle transport mediated by the COPI/Arf1 machinery is relevant for virus replication, since knocking down the expression of some of the proteins that integrate such machinery significantly impairs the yield of rotavirus progeny [141,142]; similar results are obtained when the vesicle transport is inhibited by BFA treatment of rotavirus-infected cells [76,143]. This inhibition is related to the activity of GBF1, since interfering specifically with this factor by GCA, or depletion of this nucleotide exchange factor by RNAi, significantly reduced the production of new viral infectious particles [76]. In addition, the block in the production of infectious virus was associated with the assembly of the virus surface proteins VP7 and VP4, since both BFA and GCA block the assembly of the viral surface proteins onto DLPs, preventing the production of mature infectious TLPs [76]. The restriction in the assembly of TLPs was shown to be the result of a defective trimerization of VP7, required for its assembly onto DLPs, rather than a block in the budding of DLPs into the ER lumen.

It has been shown that the inhibition of GBF1 by either BFA or GCA, or the depletion of this factor by RNAi, alters the electrophoretic mobility of the viral glycoproteins VP7 and NSP4 [76,143]. Although the altered posttranslational modification of VP7 was initially considered to explain its lack of trimerization, increasing evidence has pointed out that the alteration of NSP4 is rather responsible, since depletion of this protein or alteration of its posttranslational processing with tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation, affects the trimerization of VP7 and restricts the maturation of the transient enveloped viral particles to TLPs. [76,144,145]. In support of this observation, it was recently demonstrated that a recombinant VP7 protein overexpressed in transfected cells formed trimers only when co-expressed with NSP4 [76]. Therefore, it is likely that the altered post-translational modification is suffered by NSP4 when the expression of GBF1 is knocked down, affects its role in facilitating (directly or indirectly) the trimerization of VP7. It cannot be discarded, however, that the altered glycosylation pattern of VP7 in the presence of the pharmacological inhibitors could also have an impact in its trimerization. The altered electrophoretic mobility of VP7 in the presence of drugs or in cells depleted of GBF1 has been shown not to be related to N-glycosylation, O-glycosylation, or phosphorylation [76].

Given that GBF1 functions at the ER-Golgi interface, mediating the retrograde vesicular transport, and that rotaviruses mature in the ER, it seems likely that Golgi-ER transport is the relevant process required for the correct maturation of rotavirus. However, considering that LDs have been proposed to play a significant role in the replication cycle of these viruses, it remains possible that the protein transport between the ER and LDs is also relevant, although, a so far uncharacterized function of GBF1 cannot be discarded.

On the other hand, in support of the requirement of an active GBF1 transport during rotavirus infection, it was found that catalytically inactive mutants of GBF1 failed to support replication of the virus in the presence of BFA, suggesting that GBF1 activity is essential for rotavirus progeny production. However, given that knocking down the expression of Arf1 was found not to affect the production of infectious virus, it is likely that rotavirus replication does not depend on the GBF1/Arf1 transport but might require the activation of other GBF1 substrates, such as Arf4 or Arf5, that could compensate for the reduced level of Arf1. Moreover, it was also found that while the C-terminal domain of GBF1 is dispensable for the viral replication, the first N-terminal amino acids of this factor are essential to support replication of the virus [76]. The requirement of the N terminus of GBF1 for rotavirus replication has also been reported to be essential for the replication of CVB3 and poliovirus (see above). Thus, these results might indicate that GBF1 could bind a rotavirus protein, similar to what has been observed with the picornavirus 3A protein. However, an interaction of GBF1 with a cellular factor might also be important for virus replication. Further experiments have to be carried out to explore in more detail the mechanism through which GBF1 supports the replication cycle of rotavirus replication.

5. Concluding Remarks

As intracellular pathogens, the infection of viruses depends on their capacity to replicate successfully within the host cell. The restricted coding potential imposed by the small size of viral genomes had led the viruses to hijack essential systems of cellular functions to facilitate their replication. In this regard, emerging data have shown that many cellular factors are susceptible to be reprogrammed during viral infections to perform novel functions that benefit these pathogens. One of these cellular elements is the guanine nucleotide exchange factor GBF1, which has proved to be essential for the efficient replication of many RNA viruses. It has been shown to be required for different stages of the virus lifecycles, including the formation and maturation of viral replication complexes as well as the coordination of RNA genome replication, virus assembly, and release. The role of GBF1 has been found, principally, to depend on its ability to activate distinct Arf proteins, to regulate different transport pathways that permit the communication between the viral replication organelles and cellular organelles (ER and LDs) involved in virus infection. However, for many viruses, the role of GBF1 in virus replication has also been shown not to depend on the catalytic activity of the protein. Although it is not well understood how GBF1 could exert this non-catalytic

activity, the multidomain structure of the protein seems to play an essential role by permitting GBF1 to engage in the interaction with many cellular and viral proteins that seems to regulate, directly or indirectly, viral replication. The relevance of GBF1 for the replication of several RNA viruses identifies this factor as a potential candidate for antiviral therapies to control a broad-spectrum of viral infections. However, given the essential role of GBF1 in the secretory pathway, and in other so far ill-characterized functions of the cell, the development of safe and effective antiviral therapies that could help to deal with viral infections, without harming the host cells, represents a challenging mission.

In conclusion, the data discussed in this review bring to light a new diverse range of functions of GBF1 that might explain how this factor serves for so many processes in different compartments of the cell. Future studies aimed to clarify the mechanisms underlying the multiple functions associated with this interesting molecule would help to advance our understanding of virus and cell biology.

Funding: Some of the data reported in this review was partially supported by grant IG200317 from DGAPA-PAPIIT/UNAM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results

References

1. Roberts, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Walter, P.; Raff, M.; Alberts, B. Intracellular Vesicular Traffic. In *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed; Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Eds.; Garland Science: New York, NY, US, 2019; pp. 749–812.
2. Szul, T.; Grabski, R.; Lyons, S.; Morohashi, Y.; Shestopal, S.; Lowe, M.; Sztul, E. Dissecting the role of the Arf guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3929–3940.
3. Manolea, F.; Claude, A.; Chun, J.; Rosas, J.; Melanc, P. Distinct functions for Arf guanine nucleotide exchange factors at the Golgi complex: GBF1 and BIGs are required for assembly and maintenance of the Golgi Stack and Trans- Golgi network, Respectively. *Mol. Biol. Cell.* **2008**, *19*, 523–535.
4. Spang, A. Retrograde traffic from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, 1–12.
5. Boal, F.; Stephens, D.J. Specific functions of BIG1 and BIG2 in endomembrane organization. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9898.
6. Ward, T.H.; Polishchuk, R.S.; Caplan, S.; Hirschberg, K.; Lippincott-Schwartz, J. Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 557–570.
7. Joshi, A.S.; Zhang, H.; Prinz, W.A. Organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 876–882.
8. Springer, S.; Spang, A.; Schekman, R. Primer on vesicle budding. *Cell* **1999**, *97*, 145–148.
9. Schekman, R.; Orci, L. Coat proteins and vesicle budding. *Science* **1996**, *271*, 1526–1533.
10. Rothman, J.E.; Wieland, F.T. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **1996**, *272*, 227–234.
11. Kirchhausen, T. Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 187–198.
12. Wieland, F.; Hartert, C. Mechanisms of vesicle formation: Insights from the COP system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 440–446.
13. Barlowe, C.; Orci, L.; Yeung, T.; Hosobuchi, M.; Hamamoto, S.; Salama, N.; Rexach, M.F.; Ravazzola, M.; Amherdt, M.; Schekman, R. COPII: A membrane coat formed by set proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **1994**, *77*, 895–907.
14. Lee, M.C.S.; Miller, E.A.; Goldberg, J.; Orci, L.; Schekman, R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 87–123.
15. Popoff, V.; Adolf, F.; Brugger, B.; Wieland, F. COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005231–a005231.
16. Griffiths, G.; Pepperkok, R.; Locker, J.K.; Kreis, T.E. Immunocytochemical localization of beta-COP to the ER-Golgi boundary and the TGN. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2839–2856.

17. Duden, R.; Griffiths, G.; Frank, R.; Argos, P.; Kreis, T.E. Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell* **1991**, *64*, 649–665.
18. Puertollano, R. Clathrin-mediated transport: Assembly required. Workshop on molecular mechanisms of vesicle selectivity. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 942–946.
19. Gu, F.; Aniento, F.; Parton, R.G.; Gruenberg, J. Functional dissection of COP-I Subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J Cell Biol.* **1997**, *139*, 1183–1195.
20. Daro, E.; Sheff, D.; Gomez, M.; Kreis, T.; Mellman, I. Inhibition of endosome function in CHO Cells bearing a temperature-sensitive defect in the Coatamer (COPI) component-COP. *J Cell Biol.* **1997**, *139*, 1747–1759.
21. Botelho, R.J.; Hackam, D.J.; Schreiber, A.D.; Grinstein, S. Role of COPI in phagosome maturation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15717–15727.
22. Razi, M.; Chan, E.Y.W.; Tooze, S.A. Early endosomes and endosomal coatamer are required for autophagy. *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 305–321.
23. Lay, D.; Gorgas, K.; Just, W.W. Peroxisome biogenesis: Where Arf and coatamer might be involved. *Biochim. Biophys. Acta–Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1678–1687.
24. Beller, M.; Sztalryd, C.; Southall, N.; Bell, M.; Jäckle, H.; Auld, D.S.; Oliver, B. COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, 2530–2549.
25. Guo, Y.; Walther, T.C.; Rao, M.; Stuurman, N.; Goshima, G.; Terayama, K.; Wong, J.S.; Vale, R.D.; Walter, P.; Farese, R.V. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* **2008**, *453*, 657–661.
26. Wilfling, F.; Thiam, A.R.; Olarte, M.-J.; Wang, J.; Beck, R.; Gould, T.J.; Allgeyer, E.S.; Pincet, F.; Bewersdorf, J.; Farese, R. V; et al. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife* **2014**, *3*, e01607.
27. Donaldson, J.G.; Jackson, C.L. Arf family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 362–375.
28. Kahn, R.A.; Cherfils, J.; Elias, M.; Lovering, R.C.; Munro, S.; Schurmann, A. Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: Arf, ARL, and SAR proteins. *J. Cell Biol.* **2006**, *172*, 645–650.
29. Chavrier, P.; Ménétrey, J. Toward a structural understanding of Arf family: Effector specificity. *Structure* **2010**, *18*, 1552–1558.
30. Volpicelli-Daley, L.A.; Li, Y.; Zhang, C.-J.; Kahn, R.A. Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1–5 on membrane traffic. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 4495–4508.
31. Antonny, B.; Beraud-Dufour, S.; Chardin, P.; Chabre, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4675–4684.
32. Hsu, V.W.; Yang, J.-S. Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 3758–3763.
33. Beck, R.; Ravet, M.; Wieland, F.T.; Cassel, D.; Cassel, D. The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2701–2709.
34. Kaczmarek, B.; Verbavatz, J.M.; Jackson, C.L. GBF1 and Arf1 function in vesicular trafficking, lipid homeostasis and organelle dynamics. *Biol. Cell* **2017**, *109*, 391–399.
35. Bouvet, S.; Golinelli-Cohen, M.-P.; Contremoulins, V.; Jackson, C.L. Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 4794–4805.
36. Mossessova, E.; Corpina, R.A.; Goldberg, J. Crystal structure of Arf1*Sec7 complexed with brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1403–1411.
37. Goldberg, J. Structural basis for activation of Arf GTPase: Mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **1998**, *95*, 237–248.
38. Claude, A.; Zhao, B.-P.; Kuziemy, C.E.; Dahan, S.; Berger, S.J.; Yan, J.-P.; Arnold, A.D.; Sullivan, E.M.; Melançon, P. GBF1: A Novel Golgi-associated BFA-resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor That displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 71–84.
39. Niu, T.; Pfeifer, A.C.; Lippincott-schwartz, J.; Jackson, C.L. Dynamics of GBF1, a brefeldin A-sensitive Arf1 Exchange Factor at the Golgi. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1213–1222.
40. Szul, T.; Garcia-Mata, R.; Brandon, E.; Shestopal, S.; Alvarez, C.; Sztul, E. Dissection of membrane dynamics of the Arf-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic* **2005**, *6*, 374–385.
41. Anders, N.; Jürgens, G. Large Arf guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3433–3445.

42. Ellong, E.N.; Soni, K.G.; Bui, Q.T.; Sougrat, R.; Golinelli-Cohen, M.P.; Jackson, C.L. Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21889.
43. Meissner, J.M.; Bhatt, J.M.; Lee, E.; Styers, M.L.; Ivanova, A.A.; Kaln, R.A.; Sztul, E. The Arf guanine nucleotide exchange factor GBF1 is targeted to Golgi membranes through a PIP-binding domain. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs210245.
44. Chen, J.; Wu, X.; Yao, L.; Yan, L.; Zhang, L.; Qiu, J.; Liu, X.; Jia, S.; Meng, A. Impairment of cargo transportation caused by GBF1 mutation disrupts vascular integrity and causes hemorrhage in zebrafish embryos. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 2315–2327.
45. Pokrovskaya, I.D.; Szewedo, J.W.; Goodwin, A.; Lupashina, T.V.; Nagarajan, U.M.; Lupashin, V.V. Chlamydia trachomatis hijacks intra-Golgi COG complex-dependent vesicle trafficking pathway. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 656–668.
46. Misselwitz, B.; Dilling, S.; Vonaesch, P.; Sacher, R.; Snijder, B.; Schlumberger, M.; Rout, S.; Stark, M.; von Mering, C.; Pelkmans, L.; et al. RNAi screen of Salmonella invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and Cdc42. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *7*, 474–474.
47. Sáenz, J.B.; Sun, W.J.; Chang, J.W.; Li, J.; Bursulaya, B.; Gray, N.S.; Haslam, D.B. Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 157–165.
48. Iglesias, N.G.; Mondotte, J.A.; Byk, L.A.; De Maio, F.A.; Samsa, M.M.; Alvarez, C.; Gamarnik, A.V. Dengue virus uses a non-canonical function of the host GBF1-Arf-COPI system for capsid protein accumulation on Lipid Droplets. *Traffic* **2015**, *16*, 962–977.
49. Hafirassou, M.L.; Meertens, L.; Umaña-Díaz, C.; Labeau, A.; Dejarnac, O.; Bonnet-Madin, L.; Kümmerer, B.M.; Delaugerre, C.; Roingeard, P.; Vidalain, P.; Amara, A. A Global Interactome Map of the dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 3900–3913.
50. Vonderstein, K.; Nilsson, E.; Hubel, P.; Skalman, L.N.; Upadhyay, A.; Pasto, J.; Pichlmair, A.; Lundmark, R.; Överby, A.K. Viperin targets flavivirus virulence by inducing assembly of noninfectious capsid particles. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01751-17.
51. Ferlin, J.; Farhat, R.; Belouzard, S.; Cocquerel, L.; Bertin, A.; Hober, D.; Dubuisson, J.; Rouillé, Y. Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 1086–1096.
52. Mackenzie, J.M.; Jones, M.K.; Westaway, E.G. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* **1999**, *73*, 9555–9567.
53. Liang, W.; Zheng, M.; Bao, C.; Zhang, Y. CSFV proliferation is associated with GBF1 and Rab2. *J. Biosci.* **2017**, *42*, 43–56.
54. Goueslain, L.; Alsaleh, K.; Horellou, P.; Roingeard, P.; Descamps, V.; Duverlie, G.; Ciczora, Y.; Wychowski, C.; Dubuisson, J.; Rouille, Y. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **2010**, *84*, 773–787.
55. Tai, A.W.; Benita, Y.; Peng, L.F.; Kim, S.S.; Sakamoto, N.; Xavier, R.J.; Chung, R.T. A Functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 298–307.
56. Zhang, L.; Hong, Z.; Lin, W.; Shao, R.X.; Goto, K.; Hsu, V.W.; Chung, R.T. Arf1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32135.
57. Belov, G.A.; Ehrenfeld, E. Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 36–38.
58. Belov, G.A.; Feng, Q.; Nikovics, K.; Jackson, C.L.; Ehrenfeld, E. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000216.
59. Belov, G.A.; Kovtunovych, G.; Jackson, C.L.; Ehrenfeld, E. Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 1463–1479.
60. van der Linden, L.; van der Schaar, H.M.; Lanke, K.H.W.; Neyts, J.; van Kuppeveld, F.J.M. Differential Effects of the putative GBF1 inhibitors Golgicide A and AG1478 on enterovirus replication. *J. Virol.* **2010**, *84*, 7535–7542.
61. Lanke, K.H.W.; van der Schaar, H.M.; Belov, G.A.; Feng, Q.; Duijsings, D.; Jackson, C.L.; Ehrenfeld, E.; van Kuppeveld, F.J.M. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for Coxsackievirus B3 RNA replication. *J. Virol.* **2009**, *83*, 11940–11949.

62. Hsu, N.Y.; Ilnytska, O.; Belov, G.; Santiana, M.; Chen, Y.H.; Takvorian, P.M.; Pau, C.; van der Schaar, H.; Kaushik-Basu, N.; Balla, T.; et al. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **2010**, *141*, 799–811.
63. Qin, Y.; Lin, L.; Chen, Y.; Wu, S.; Si, X.; Wu, H.; Zhai, X.; Wang, Y.; Tong, L.; Pan, B.; et al. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro. *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4*, 284–294.
64. Wang, J.; Du, J.; Jin, Q. Class I ADP-ribosylation factors are involved in enterovirus 71 replication. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99768.
65. Dorobantu, C.M.; Ford-Siltz, L.A.; Sittig, S.P.; Lanke, K.H.W.; Belov, G.A.; van Kuppeveld, F.J.M.; van der Schaar, H.M. GBF1- and ACBD3-independent recruitment of PI4KIII β to replication sites by rhinovirus 3A proteins. *J. Virol.* **2015**, *89*, 1913–1918.
66. Zhang, N.; Zhang, L. Key components of COPI and COPII machineries are required for chikungunya virus replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 1190–1196.
67. Molina, S.; Sanz, M.A.; Madan, V.; Ventoso, I.; Castelló, A.; Carrasco, L. Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A. *Virology* **2007**, *363*, 430–436.
68. Farhat, R.; Ankavay, M.; Lebsir, N.; Gouttenoire, J.; Jackson, C.L.; Wychowski, C.; Moradpour, D.; Dubuisson, J.; Rouillé, Y.; Cocquerel, L. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12804.
69. Verheije, M.H.; Raaben, M.; Mari, M.; Te Lintelo, E.G.; Reggiori, F.; van Kuppeveld, F.J.M.; Rottier, P.J.M.; de Haan, C.A.M. Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated Arf1 activation. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000088.
70. Knoops, K.; Swett-Tapia, C.; van den Worm, S.H.E.; te Velhuis, A.J.W.; Koster, A.J.; Mommaas, A.M.; Snijder, E.J.; Kikkert, M. Integrity of the early secretory pathway promotes, but is not required for, severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA synthesis and virus-induced remodeling of endoplasmic reticulum membranes. *J. Virol.* **2010**, *84*, 833–846.
71. De Wilde, A.H.; Wannee, K.F.; Scholte, F.E.M.; Goeman, J.J.; ten Dijke, P.; Snijder, E.J.; Kikkert, M.; van Hemert, M.J. A kinome-wide small interfering RNA screen identifies proviral and antiviral host factors in severe acute respiratory syndrome coronavirus replication, including double-stranded RNA-activated protein kinase and early secretory pathway proteins. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8318–8333.
72. Panda, D.; Das, A.; Dinh, P.X.; Subramaniam, S.; Nayak, D.; Barrows, N.J.; Pearson, J.L.; Thompson, J.; Kelly, D.L.; Ladunga, I.; et al. RNAi screening reveals requirement for host cell secretory pathway in infection by diverse families of negative-strand RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 19036–19041.
73. Sun, E.; He, J.; Zhuang, X. Dissecting the role of COPI complexes in influenza virus infection. *J. Virol.* **2013**, *87*, 2673–2685.
74. Watanabe, T.; Kawakami, E.; Shoemaker, J.E.; Lopes, T.J.S.; Matsuoka, Y.; Tomita, Y.; Kozuka-Hata, H.; Gorai, T.; Kuwahara, T.; Takeda, E.; et al. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 795–805.
75. Yadav, V.; Panganiban, A.T.; Honer Zu Bentrup, K.; Voss, T.G. Influenza infection modulates vesicular trafficking and induces Golgi complex disruption. *Virus Disease* **2016**, *27*, 357–368.
76. Martínez, J.L.; Arnoldi, F.; Schraner, E.M.; Eichwald, C.; Silva-Ayala, D.; Lee, E.; Sztul, E.; Burrone, Ó.R.; López, S.; Arias, C.F. The guanine nucleotide exchange factor GBF1 participates in rotavirus replication. *J. Virol.* **2019**, *93*, e01062-19.
77. Apte-Sengupta, S.; Sirohi, D.; Kuhn, R.J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *9*, 134–142.
78. Samsa, M.M.; Mondotte, J.A.; Iglesias, N.G.; Assunção-Miranda, I.; Barbosa-Lima, G.; Da Poian, A.T.; Bozza, P.T.; Gamarnik, A.V. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000632.
79. Carpp, L.N.; Rogers, R.S.; Moritz, R.L.; Aitchison, J.D. Quantitative proteomic analysis of host-virus interactions reveals a role for Golgi brefeldin A resistance factor 1 (GBF1) in dengue infection. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2836–2854.
80. Kudelko, M.; Brault, J.B.; Kwok, K.; Li, M.Y.; Pardigon, N.; Peiris, J.S.M.; Bruzzone, R.; Despre, P.; Nal, B.; Wang, P.G. Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 767–777.

81. Farias, K.J.S.; Machado, P.R.L.; de Almeida Júnior, R.F.; Lopes da Fonseca, B.A. Brefeldin A and cytochalasin B reduce dengue virus replication in cell cultures but do not protect mice against viral challenge. *Access Microbiol.* **2019**, *1*, e000041.
82. Helbig, K.J.; Carr, J.M.; Calvert, J.K.; Wati, S.; Clarke, J.N.; Eyre, N.S.; Narayana, S.K.; Fiches, G.N.; McCartney, E.M.; Beard, M.R. Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2178.
83. Szretter, K.J.; Brien, J.D.; Thackray, L.B.; Virgin, H.W.; Cresswell, P.; Diamond, M.S. The Interferon-inducible gene viperin restricts West Nile virus pathogenesis. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11557–11566.
84. Hutagalung, A.H.; Novick, P.J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 119–149.
85. Kim, C.W.; Chang, K.-M. Hepatitis C virus: Virology and life cycle. *Clin. Mol. Hepatol.* **2013**, *19*, 17–25.
86. Paul, D.; Madan, V.; Bartenschlager, R. Hepatitis C Virus RNA replication and assembly: Living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 569–579.
87. Egger, D.; Wölk, B.; Gosert, R.; Bianchi, L.; Blum, H.E.; Moradpour, D.; Bienz, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **2002**, *76*, 5974–5984.
88. Romero-Brey, I.; Merz, A.; Chiramel, A.; Lee, J.Y.; Chlanda, P.; Haselman, U.; Santarella-Mellwig, R.; Habermann, A.; Hoppe, S.; Kallis, S.; et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1003056.
89. Dustin, L.B.; Bartolini, B.; Capobianchi, M.R.; Pistello, M. Hepatitis C virus: Life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 826–832.
90. Matto, M.; Sklan, E.H.; David, N.; Melamed-Book, N.; Casanova, J.E.; Glenn, J.S.; Aroeti, B. Role for ADP ribosylation factor 1 in the regulation of hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **2010**, *85*, 946–956.
91. Farhat, R.; Séron, K.; Ferlin, J.; Fénéant, L.; Belouzard, S.; Goueslain, L.; Jackson, C.L.; Dubuisson, J.; Rouillé, Y. Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cell. Microbiol.* **2016**, *18*, 1121–1133.
92. Zhang, N.; Yin, P.; Zhou, L.; Li, H.; Zhang, L. Arf1 activation dissociates ADRP from lipid droplets to promote HCV assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *475*, 31–36.
93. Fukasawa, M. Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 355–359.
94. Gastaminza, P.; Cheng, G.; Wieland, S.; Zhong, J.; Liao, W.; Chisari, F.V. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* **2007**, *82*, 2120–2129.
95. Farhat, R.; Goueslain, L.; Wychowski, C.; Belouzard, S.; Fénéant, L.; Jackson, C.L.; Dubuisson, J.; Rouillé, Y. Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin A-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74491.
96. Li, H.; Yang, X.; Yang, G.; Hong, Z.; Zhou, L.; Yin, P.; Xiao, Y.; Chen, L.; Chung, R.T.; Zhang, L. Hepatitis C virus NS5A hijacks ArfGAP1 to maintain a phosphatidylinositol 4-phosphate-enriched microenvironment. *J. Virol.* **2014**, *88*, 5956–5966.
97. Balla, A.; Balla, T. Phosphatidylinositol 4-kinases: Old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 351–361.
98. Lebsir, N.; Goueslain, L.; Farhat, R.; Callens, N.; Dubuisson, J.; Jackson, C.L.; Rouillé, Y. Functional and physical interaction between the Arf Activator GBF1 and hepatitis C virus NS3 Protein. *J. Virol.* **2019**, *93*, e01459-18.
99. Maynell, L.a.; Kirkegaard, K.; Klymkowsky, M.W. Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J. Virol.* **1992**, *66*, 1985–1994.
100. Cuconati, A.; Molla, A.; Wimmer, E. Brefeldin A inhibits cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 6456–6464.
101. Wang, J.; Wu, Z.; Jin, Q. COPI is required for enterovirus 71 replication. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38035.
102. Gazina, E.V.; Mackenzie, J.M.; Gorrell, R.J.; Anderson, D.A. Differential Requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of *Picornaviridae*. *J. Virol.* **2002**, *76*, 11113–11122.
103. O'Donnell, V.K.; Pacheco, J.M.; Henry, T.M.; Mason, P.W. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **2001**, *287*, 151–162.

104. Belov, G.A.; Altan-Bonnet, N.; Kovtunovych, G.; Jackson, C.L.; Lippincott-Schwartz, J.; Ehrenfeld, E. Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J. Virol.* **2006**, *81*, 558–567.
105. Wessels, E.; Duijsings, D.; Niu, T.K.; Neumann, S.; Oorschot, V.M.; de Lange, F.; Lanke, K.H.W.; Klumperman, J.; Henke, A.; Jackson, C.L.; et al. A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev. Cell* **2006**, *11*, 191–201.
106. Wessels, E.; Notebaart, R.A.; Melchers, W.J.G.; Kuppeveld, F.J.M. Van; Irol, J. V A Proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5163–5173.
107. Wessels, E.; Duijsings, D.; Lanke, K.H.W.; van Dooren, S.H.J.; Jackson, C.L.; Melchers, W.J.G.; van Kuppeveld, F.J.M. Effects of picornavirus 3A proteins on protein transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11852–11860.
108. Wessels, E.; Duijsings, D.; Lanke, K.H.W.; Melchers, W.J.G.; Jackson, C.L.; van Kuppeveld, F.J.M. Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5238–5245.
109. Belov, G. a; Fogg, M.H.; Ehrenfeld, E. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7207–7216.
110. Doedens, J.R.; Kirkegaard, K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* **1995**, *14*, 894–907.
111. Belov, G.A.; Sztul, E. Rewiring of cellular membrane homeostasis by picornaviruses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 9478–9489.
112. Viktorova, E.G.; Nchoutmboube, J.A.; Ford-Siltz, L.A.; Iverson, E.; Belov, G.A. Phospholipid synthesis fueled by lipid droplets drives the structural development of poliovirus replication organelles. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007280.
113. Soni, K.G.; Mardones, G.A.; Sougrat, R.; Smirnova, E.; Jackson, C.L.; Bonifacino, J.S. Coatmer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1834–1841.
114. Irurzun, A.; Perez, L.; Carrasco, L. Involvement of membrane traffic in the replication of poliovirus genomes: Effects of brefeldin A. *Virology* **1992**, *191*, 166–175.
115. Sasaki, J.; Ishikawa, K.; Arita, M.; Taniguchi, K. ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J.* **2012**, *31*, 754–766.
116. Kuhn, R.J. Togaviridae. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 629–650.
117. Jose, J.; Taylor, A.B.; Kuhn, R.J. Spatial and temporal analysis of alphavirus replication and assembly in mammalian and mosquito cells. *MBio* **2017**, *8*, e02294-16.
118. Madan, V.; Sanz, M.A.; Carrasco, L. Requirement of the vesicular system for membrane permeabilization by Sindbis virus. *Virology* **2005**, *332*, 307–315.
119. Barletta, A.B.F.; Alves, L.R.; Nascimento Silva, M.C.L.; Sim, S.; Dimopoulos, G.; Liechocki, S.; Maya-Monteiro, C.M.; Sorgine, M.H.F. Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and dengue virus. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19928.
120. Emerson, S.U.; Purcell, R.H. Hepatitis E virus. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 2242–2258.
121. Masters, P.S.; Perlman, S. Coronaviridae. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 825–858.
122. Fehr, A.R.; Perlman, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1282*, 1–23.
123. Dascher, C.; Balch, W.E. Dominant inhibitory mutants of Arf1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1437–1448.
124. Lyles, D.S.; Kuzmin, I.V.; Rupprecht, C.E. Rhabdoviridae. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 885–922.
125. Irurzun, A.; Pérez, L.; Carrasco, L. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 496–500.
126. Cureton, D.K.; Burdeinick-Kerr, R.; Whelan, S.P.J. Genetic inactivation of COPI coatmer separately inhibits vesicular stomatitis virus entry and gene expression. *J. Virol.* **2012**, *86*, 655–666.

127. Chadha, M.S.; Arankalle, V.A.; Jadi, R.S.; Joshi, M.V.; Thakare, J.P.; Mahadev, P.V.M.; Mishra, A.C. An outbreak of Chandipura virus encephalitis in the eastern districts of Gujarat state, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *73*, 566–570.
128. Gurav, Y.K.; Tandale, B.V.; Jadi, R.S.; Gunjkar, R.S.; Tikute, S.S.; Jamgaonkar, A.V.; Khadse, R.K.; Jalgaonkar, S.V.; Arankalle, V.A.; Mishra, A.C. Chandipura virus encephalitis outbreak among children in Nagpur division, Maharashtra, 2007. *Indian J. Med. Res.* **2010**, *132*, 395–399.
129. Rajasekharan, S.; Rana, J.; Gulati, S.; Sharma, S.K.; Gupta, V.; Gupta, S. Predicting the host protein interactors of Chandipura virus using a structural similarity-based approach. *Pathog. Dis.* **2013**, *69*, 29–35.
130. Heinrich, B.S.; Cureton, D.K.; Rahmeh, A.A.; Whelan, S.P.J. Protein expression redirects vesicular stomatitis virus RNA synthesis to cytoplasmic inclusions. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000958.
131. Andrew Whitney, J.; Gomez, M.; Sheff, D.; Kreis, T.E.; Mellman, I. Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function. *Cell* **1995**, *83*, 703–713.
132. Dou, D.; Revol, R.; Östbye, H.; Wang, H.; Daniels, R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1581.
133. Shaw, M.L.; Palese, P. Orthomyxoviridae. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 1151–1185.
134. Amorim, M.J.; Bruce, E.A.; Read, E.K.C.; Foeglein, Á.; Mahen, R.; Stuart, A.D.; Digard, P. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A Virus viral RNA. *J. Virol.* **2011**, *85*, 4143–4156.
135. Momose, F.; Sekimoto, T.; Ohkura, T.; Jo, S.; Kawaguchi, A.; Nagata, K.; Morikawa, Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21123.
136. De Castro Martin, I.F.; Fournier, G.; Sachse, M.; Pizarro-Cerda, J.; Risco, C.; Naffakh, N. Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1396.
137. Jo, S.; Kawaguchi, A.; Takizawa, N.; Morikawa, Y.; Momose, F.; Nagata, K. Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome. *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 1079–1084.
138. König, R.; Stertz, S.; Zhou, Y.; Inoue, A.; Hoffmann, H.H.; Bhattacharyya, S.; Alamares, J.G.; Tscherne, D.M.; Ortigoza, M.B.; Liang, Y.; et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **2010**, *463*, 813–817.
139. Estes, M.K.; Greenberg, H.B. Rotaviruses. In *Fields Virology*; Knipe, M.D., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 1347–1401.
140. Maass, D.; Atkinson, P. H. Rotavirus Proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J. Virol.* **1990**, *64*, 2632–2641.
141. Green, V.A.; Pelkmans, L. A systems survey of progressive host-cell reorganization during rotavirus infection. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 107–120.
142. Silva-Ayala, D.; Lopez, T.; Gutierrez, M.; Perrimon, N.; Lopez, S.; Arias, C.F. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 10270–10275.
143. Mirazimi, A.; Von Bonsdorff, C.H.; Svensson, L. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology* **1996**, *217*, 554–563.
144. Cuadras, M.A.; Bordier, B.B.; Zambrano, J.L.; Ludert, J.E.; Greenberg, H.B. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: Insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J. Virol.* **2006**, *80*, 3935–3946.
145. Petrie, B.L.; Estes, M.K.; Graham, D.Y. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J. Virol.* **1983**, *46*, 270–274.

