



Universidad Autónoma de Madrid



# **Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias**

## **Variabilidad estructural en el género rotavirus**

**- TESIS DOCTORAL -**

**Dunia Asensio Cob  
Madrid, 2022**



Universidad Autónoma de Madrid



# Universidad Autónoma de Madrid

## Departamento de Biología Molecular Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en  
Biociencias Moleculares por

**Dunia Asensio Cob**

Universidad Autónoma de Madrid  
Marzo de 2022

### **DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. Javier María Rodríguez Martínez**  
CNB-CSIC

**Dr. Daniel Luque Buzo**  
UCCT-ISCIH

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (CNM-ISCIH) bajo la dirección del Dr. Javier María Rodríguez Martínez (CNB-CSIC) y el Dr. Daniel Luque Buzo (UCCT-ISCIH). Su financiación corrió a cargo de una beca-contrato de formación de personal investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Asuntos Económicos y Transformación Digital.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Javier M<sup>a</sup> Rodríguez y Daniel Luque, la oportunidad que me brindaron de iniciar mi camino en el mundo de la investigación y permitirme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Sin vosotros, esto no hubiera sido posible y gracias que hemos realizado juntos en el día a día he podido conocer un poco más acerca de este mundillo de la investigación. A nivel profesional, quiero agradeceros todo el tiempo que habéis dedicado estos años, vuestras correcciones, consejos y explicaciones diversos ámbitos. Gracias a los dos por permitirme aprender a planificarme y realizar numerosos experimentos, cada cual más interesante, en el laboratorio y por las jornadas de adquisición de datos y procesamiento de imágenes que me han permitido acercarme al mundo de la criomicroscopía. Gracias a los dos por todo el conocimiento técnico que en el día a día ha hecho que este trabajo sea mucho más fácil de desarrollar. A nivel personal, no tengo palabras para expresar todo el apoyo y los ánimos que me habéis dado especialmente en aquellos días o semanas en las que la cosa parecía no avanzar... Sobre todas estas cosas, os quiero agradecer el entusiasmo y pasión que me habéis transmitido cada día, que me han enseñado a disfrutar, a trabajar con alegría y a seguir desarrollando de forma persistente los diversos proyectos de investigación que teníamos entre manos. Por último, quiero agradeceros y reconocer la valía que merecéis en todos los ámbitos, a nivel profesional y personal, incluso en momentos de lo más imprevistos como durante el fascinante ‘congreso’ en Bilbao en 2019, del que guardo ‘memorables recuerdos’. Gracias por ser como una familia en ese momentos y en tantos otros. Gracias por los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. Gracias por haber escuchado y valorado mis ideas, por haberme dado consejos y guía pero también independencia y confianza.

Siguiendo esta línea, también quiero agradecer mis compañeros de laboratorio por su compañía, apoyo y ayuda durante estos años. Gracias Carmen por tus enseñanzas, comentarios, críticas y sugerencias siempre tan acertadas. Gracias por todo el cariño y cuidado, especialmente durante los momentos de más estrés. Siempre recordaré con cariño los buenos momentos compartidos contigo, las comidas, los días interminables de preparación de inclusiones y rejillas, eso sí, siempre acompañadas de buen humor y música. Gracias por tu ayuda con los cortes de las inclusiones y el tiempo dedicado a ver las numerosas rejillas que se han preparado para este tesis y otros proyectos. Gracias a Ester por toda su ayuda en el laboratorio durante mi primera etapa en el laboratorio. Gracias por ayudarme con las técnicas de biología molecular y a familiarizarme en el laboratorio. Gracias por enseñarme a organizarme y trabajar en el laboratorio, hasta el día de hoy todo lo que me enseñaste me ayuda a llevar una mejor organización en el laboratorio. Gracias Amparo y Esperanza por sus experimentadas críticas y aportaciones a este trabajo. Gracias M<sup>a</sup>José por tu apoyo, consejos y buen ánimo que transmites. Gracias Clara, gracias por tu continua sonrisa y buen humor. *Thank you, Martin, for your support during the last part of the thesis and for your kindness everyday. Thank you for your knowledge and your help with the Talos.* Gracias por animarme a continuar. Gracias Carlos, por tu continua ayuda, estando en UK y ahora aquí en Madrid, y paciencia para resolver todas mis dudas. Gracias por tus apreciadas sugerencias con el trazado del modelo atómico de la espícula y otras estructuras de rota. Gracias a todos por el buen ambiente en nuestro grupo del que siempre he podido disfrutar y por aguantarme en mis buenos y malos momentos de estrés. ¡Os voy a echar mucho de menos a todos!

Quiero dar las gracias a todos los estudiantes y personas que han pasado por aquí a lo largo de los años que me han ayudado a madurar como investigadora así como a compañeros de otros laboratorios que han estado presentes para ayudarme en muchos momentos durante la tesis.

Gracias a José Antonio Melero, que aunque ya no está entre nosotros, me permitió iniciar mi etapa predoctoral en el CNM. Gracias a él y a todos los miembros del laboratorio: Tito, Blanca, Concha, Mónica, Olga, Teresa y Edu. Gracias por vuestra paciencia con los temas administrativos y por ayudarme a usar los equipos y columnas de cromatografía. Gracias por el trabajo de colaboración que hemos realizado en numerosas ocasiones y por vuestro apoyo y consejo que me ha ayudado a realizar esta tesis.

Gracias a los compañeros de otros centros de investigación que siempre me han ayudado y facilitado el camino en investigación. Gracias Javier Vargas y Josué por vuestras enseñanzas y contribución en la generación de mapas y modelado de estructuras atómicas. Gracias por la oportunidad que me brindasteis de realizar una estancia con vosotros (que me cambió la vida en muchos aspectos) y por todos los momentos compartidos en Canadá. Os agradezco a cada uno de vosotros vuestra contribución en este proyecto. *Thank you, Satinder, Swathi, Rubén and Alex for the time we could spend together. Thank you for having such good times after the work in the laboratory. Thank you for your welcome on my arrival in Montreal, it was short but memorable.*

Gracias Rocío Arranz y Javier Chichón por vuestro trabajo y ayuda durante las sesiones de microscopia en el CNB. Gracias a todo el equipo de microscopía y procesamiento de imagen del CNB y del ISCIII por estar siempre dispuestos a resolver dudas y problemas, en especial a Roberto Marabini por su ayuda durante mi formación. Carol, gracias por tus ánimos en todo momento y por tu disposición a ayudarme siempre, gracias por apoyarme especialmente en las últimas etapas. Gracias David por tu ayuda y por los buenos momentos compartidos en mis visitas al CNB y en las tuyas por el CNM. Gracias Pepe por tu interés sobre mi trabajo durante las visitas que os hacía y por tus comentarios en los congresos que compartimos.

Gracias a mi familia por su apoyo constante e incondicional. De forma especial quiero dar las gracias a mi madre por acompañarse día a día en este camino, por su cuidado y apoyo incondicional, por devolverme la ilusión por la investigación cuando más cuesta arriba se hacía. Gracias por demostrarme que lo imposible se puede hacer posible. Gracias a mi tía por su apoyo y charlas motivadoras, siempre las guardo conmigo. Gracias a mi padre por su apoyo durante esta tesis y su incansable buen ánimo. *Thank you Kanishk for supporting me at any moment and for helping me to fulfill my dreams. Thank you for your company that makes me happier every day. Thank you for your patience specially during the last year of my PhD.*

Finalmente, quiero reconocer el continuo apoyo de mis amigos que han sabido comprenderme, acompañarme y me han animado siempre a proseguir con esta tesis. Gracias por vuestro apoyo, charlas y salidas durante este tiempo. Gracias por vuestra amistad y cariño.

Por último, gracias a los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias para la conclusión de esta tesis.

*“So much has been given to me I have not time to ponder over that which has been denied.”*

— Helen Keller

## ABREVIATURAS

<b>2D:</b>	bidimensional	<b>kb:</b>	kilobase
<b>3D:</b>	tridimensional	<b>kDa:</b>	kilodalton
<b>3DR:</b>	reconstrucción tridimensional		
<b>aa:</b>	aminoácido	<b>ME:</b>	microscopía electrónica
<b>BEVS:</b>	sistema de expresión con baculovirus recombinantes ( <i>Baculovirus expresión vector system</i> )	<b>MEP:</b>	partículas envueltas transitorias ( <i>membrane enveloped particles</i> )
<b>BV:</b>	baculovirus	<b>mRNA:</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>crioME:</b>	criomicroscopía electrónica	<b>NSP:</b>	proteína no estructural
<b>crioTE:</b>	criotomografía electrónica	<b>N-terminal:</b>	amino terminal
<b>CsCl:</b>	cloruro de cesio	<b>NTR-TLP:</b>	TLP no tripsinizada
<b>C-terminal:</b>	carboxilo terminal	<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>CTF:</b>	función de transferencia de contraste	<b>ORF:</b>	<i>Open reading frame</i> (fase abierta de lectura)
<b>DLP:</b>	partícula de doble capa ( <i>double-layered particle</i> )	<b>pb:</b>	par de bases
<b>DNA:</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino
<b>dsDNA:</b>	ácido desoxirribonucleico de cadena doble	<b>PDB:</b>	<i>Protein Data Bank</i> (base de datos de proteínas)
<b>dsRNA:</b>	ácido ribonucleico de cadena doble	<b>PEG:</b>	polietilenglicol
<b>EDTA:</b>	ácido etilendiaminotetraacético	<b>rBV:</b>	baculovirus recombinante
<b>FBS:</b>	suero fetal bovino	<b>RE:</b>	retículo endoplasmático
<b>FSC:</b>	Fourier Shell Correlation	<b>RdRp:</b>	RNA polimerasa RNA dependiente
<b>H5:</b>	células de insecto <i>HighFive</i>	<b>RNA:</b>	ácido ribonucleico
<b>hpi:</b>	horas postinfección	<b>(+)ssRNA:</b>	ácido ribonucleico de polaridad positiva de cadena simple
<b>Hsc70:</b>	proteína de choque térmico de 70 KDa	<b>(-)ssRNA:</b>	ácido ribonucleico de polaridad negativa de cadena simple

<b>RV:</b>	Rotavirus
<b>SDS:</b>	dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE:</b>	electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>SLP:</b>	<i>core</i> o partículas de una capa SLP ( <i>single-layered particle</i> )
<b>SPA:</b>	análisis de partículas individuales ( <i>single particle analysis</i> )
<b>T:</b>	número de triangulación
<b>TLP:</b>	partícula de triple capa TLP ( <i>triple- layered particle</i> )
<b>Tris:</b>	tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>TR-TLP:</b>	TLP tripsinizada
<b>ufp:</b>	unidad formadora de placa
<b>UTR:</b>	región no traducida
<b>VLP:</b>	pseudo-partícula viral
<b>vDLP:</b>	pseudo-DLP
<b>VP:</b>	proteína estructural
<b>vSLP:</b>	pseudo-SLP
<b>vTLP:</b>	pseudo-TLP

## CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

<b>Alanina</b>	Ala, A	<b>Leucina</b>	Leu, L
<b>Arginina</b>	Arg, R	<b>Lisina</b>	Lys, K
<b>Ácido aspártico</b>	Asp, D	<b>Metionina</b>	Met, M
<b>Asparagina</b>	Asn, N	<b>Fenilalanina</b>	Phe, F
<b>Cisteína</b>	Cys, C	<b>Prolina</b>	Pro, P
<b>Ácido Glutámico</b>	Glu, E	<b>Serina</b>	Ser, S
<b>Glicina</b>	Gly, G	<b>Tirosina</b>	Tyr, Y
<b>Glutamina</b>	Gln, Q	<b>Treonina</b>	Thr, T
<b>Histidina</b>	His, H	<b>Triptófano</b>	Trp, W
<b>Isoleucina</b>	Ile, I	<b>Valina</b>	Val, V

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
1.1 Organización genómica de rotavirus .....	8
1.2 Estructura de la partícula de rotavirus .....	9
1.3 Activación de la espícula de RV y cambios estructurales asociados .....	14
1.4 Morfogénesis. Ciclo viral.....	15
1.5 Clasificación y epidemiología .....	19
1.6 Producción de pseudopartículas similares a virus de rotavirus.....	20
<b>2. Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
3.1 Material biológico .....	31
3.1.1 Células procariotas .....	31
3.1.2 Células eucariotas.....	31
3.1.3 Virus.....	31
3.1.4 Plásmidos .....	32
3.1.5 Preparación de báculos recombinantes.....	33
3.2 Infecciones, transfecciones y expresión de proteínas .....	33
3.2.1 Transformación de células de insecto con DNA de báculo .....	33
3.2.2 Infecciones de células de insecto con baculovirus.....	34
3.2.3 Determinación de la concentración de rBV infectivos .....	34
3.3 Purificación de proteínas y ensamblados virales .....	35
3.3.1 Purificación de partículas virales de rotavirus .....	35
3.3.2 Preparación de DLP .....	36
3.3.3 Purificación de ensamblados del sobrenadante de infecciones con rBV.....	36
3.3.4 Purificación de ensamblados del interior celular derivados de la expresión con rBV..	37
3.4 Análisis bioquímico .....	38
3.4.1 Análisis electroforético en geles desnaturizantes de poliacrilamida .....	38
3.5 Microscopía electrónica .....	38
3.5.1 Adsorción de muestras y tinción negativa .....	38
3.5.2 Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión .....	39
3.5.3 Criomicroscopía electrónica.....	39
3.6 Procesamiento de imágenes .....	46
<b>4. Resultados</b>	<b>47</b>
4.1. Determinación de la estructura atómica del virión de RV .....	49

4.1.1.	Purificación y análisis por criomicroscopía electrónica de TLP .....	49
4.1.2.	Análisis estructural de la espícula de NTR- y TR-TLP .....	51
4.1.3.	Construcción y análisis de un modelo atómico de TR-TLP y NTR-TLP.....	54
4.2.	Caracterización estructural de vDLP de RVA.....	60
4.2.1.	Expresión y purificación de vDLP de RVA .....	60
4.2.2.	Preparación y análisis de la DLP de SA11 .....	66
4.3.	Expresión y caracterización de partículas vDLP de los distintos grupos de RV.....	72
4.3.1.	Generación, caracterización bioquímica y análisis por microscopía electrónica .....	72
4.3.2.	Efecto de la línea celular en la formación de vDLP.....	74
4.3.3.	Análisis ultraestructural de la formación de partículas vDLP.....	75
4.4.	Purificación de vDLP de extractos de células infectadas .....	80
4.5.	Influencia de la actividad proteasa en la formación de vDLP .....	84
4.6.	Caracterización estructural de partículas vDLP de otros grupos de RV .....	85
4.6.1.	Caracterización bioquímica, análisis por criome y obtención del modelo atómico de las vDLP de RVD y RVI.....	86
4.6.2.	Comparación estructural de las partículas vDLP de RVD y RVI con la partícula vDLP de RVA .....	88
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	<b>97</b>
5.1.	Implicaciones estructurales de la activación de la espícula de rotavirus.....	99
5.2.	VLPs como modelo para la caracterización estructural de partículas virales de rotavirus.	104
5.3.	Análisis y caracterización estructural de los modelos atómicos de vDLP de RVD y RVI.	109
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos</b>	<b>119</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>141</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización genómica de RV y estructura de su partícula viral	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Composición y estructura de la TLP y de las subpartículas virales de RV	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura de la partícula de RV	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura atómica de la espícula de rotavirus	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Representación de la espícula y su entorno. Estructura de las espículas en TR- y NTR-TLP	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> El ciclo de replicación de RV	<b>16</b>
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de los reordenamientos estructurales propuestos de la espícula durante la entrada de RV	<b>17</b>
<b>Figura 8.</b> ME por tinción negativa de diferentes VLP de RV producidas por coexpresión de los rBV indicados	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Dibujo esquemático del plásmido pFastBacDual para la generación de los rBV	<b>32</b>
<b>Figura 10.</b> Metodología del procesamiento digital de las imágenes de partículas de rotavirus	<b>42</b>
<b>Figura 11.</b> Metodología del procesamiento digital para la obtención de las estructuras a resolución atómica de las espículas de TLP de rotavirus	<b>44</b>
<b>Figura 12.</b> Análisis de RV SA11 NTR- y TR-TLP por SDS-PAGE y criomicroscopía electrónica	<b>50</b>
<b>Figura 13.</b> Análisis de la resolución local de los mapas 3D obtenidos de la NTR- y TR-TLP	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b> Análisis de la resolución local de las espículas en las diferentes etapas del refinamiento de las subpartículas de NTR-TLP y TR-TLP	<b>53</b>
<b>Figura 15.</b> Análisis de las estructuras atómicas de SA11 NTR- y TR-TLP	<b>55</b>
<b>Figura 16.</b> Estructura atómica de la espícula de RV	<b>57</b>
<b>Figura 17.</b> Representación de la expansión de la estructura de la espícula tras su activación	<b>58</b>
<b>Figura 18.</b> Análisis de la estructura atómica de diferentes dominios de las espículas NTR y TR	<b>59</b>

<b>Figura 19.</b> Análisis de la expresión de proteínas VP2 y VP6 y formación de vDLP de RVA	<b>61</b>
<b>Figura 20.</b> Análisis de la expresión de las proteínas VP2 y VP6 de RVA en células H5	<b>63</b>
<b>Figura 21.</b> Análisis mediante microscopía electrónica de partículas purificadas de vDLPA	<b>63</b>
<b>Figura 22.</b> Comparación de la expresión y purificación de vDLP ensambladas en las líneas celulares H5 y Sf9	<b>65</b>
<b>Figura 23.</b> Comparación de la expresión de VP2 y VP6 en células H5 utilizando diferentes multiplicidades de infección	<b>66</b>
<b>Figura 24.</b> Reconstrucción tridimensional de la vDLP y comparación con la DLP	<b>67</b>
<b>Figura 25.</b> Análisis de la resolución local de los mapas 3D obtenidos de la DLP y la vDLP	<b>69</b>
<b>Figura 26.</b> Análisis de las estructuras atómicas de la DLP y vDLP de RVA	<b>70</b>
<b>Figura 27.</b> Representación de la expansión producida entre la estructura de la DLP y vDLP	<b>71</b>
<b>Figura 28.</b> Caracterización de la expresión de VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV en la línea celular H5	<b>73</b>
<b>Figura 29.</b> Caracterización de la expresión de VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV en las líneas celulares Sf9 y Sf21	<b>74</b>
<b>Figura 30.</b> Análisis por microscopía electrónica y tinción negativa del material particulado obtenido de los sobrenadantes de infección de los diferentes grupos de RV en las líneas celulares Sf9 y Sf21	<b>76</b>
<b>Figura 31.</b> Caracterización ultraestructural de células H5 infectadas con rBVs para la expresión conjunta de las proteínas VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV	<b>78</b>
<b>Figura 32.</b> Caracterización ultraestructural de células Sf9 infectadas con rBVs infectadas con rBVs para la expresión conjunta de las proteínas VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV	<b>79</b>
<b>Figura 33.</b> Análisis bioquímico de la fase soluble de extractos celulares tratados con detergentes y Vertrel	<b>81</b>
<b>Figura 34.</b> Análisis por microscopía electrónica por tinción negativa de ensamblados purificados del interior de células H5, Sf9 y Sf21	<b>84</b>
<b>Figura 35.</b> Análisis de la expresión de proteínas VP2 y VP6 y formación de vDLPs en rBV MultiBac	<b>85</b>

<b>Figura 36.</b> Análisis bioquímico y reconstrucción 3D mediante análisis de partículas individuales de vDLP de RVD y RVI	<b>87</b>
<b>Figura 37.</b> Comparación de los mapas de densidad obtenidos de las partículas vDLP de RVA, RVD y RVI	<b>89</b>
<b>Figura 38.</b> Análisis y comparación de las estructuras atómicas de la estructura de VP2 de la partícula vDLPA y vDLPD	<b>91</b>
<b>Figura 39.</b> Análisis y comparación de las estructuras atómicas de VP2 de la vDLP de RVA y RVI	<b>92</b>
<b>Figura 40.</b> Análisis y comparación de las estructuras atómicas de VP6 de la vDLP de RVA y RVI	<b>93</b>
<b>Figura 41.</b> Transiciones estructurales de la espícula de RV durante la entrada celular	<b>100</b>
<b>Figura 42.</b> Transiciones estructurales durante la entrada de RV	<b>101</b>
<b>Figura 43.</b> Accesibilidad de los sitios de unión a glicanos de los dominios lectina	<b>102</b>
<b>Figura 44.</b> Representación de las secuencias de aminoácidos de VP4 de diferentes cepas de RV	<b>104</b>

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias empleadas para la construcción de los rBV	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de adquisición y procesamiento digital para cada una de las muestras estudiadas	<b>41</b>
<b>Tabla 3.</b> Cantidad de vDLP de RVA evidenciadas mediante microscopía electrónica a diferentes temperaturas de incubación a lo largo de diferentes tiempos post-infección	<b>64</b>
<b>Tabla 4.</b> Alineamiento estructural de las estructuras de la DLP y vDLP con Dali	<b>72</b>
<b>Tabla 5.</b> Pesos moleculares de las diferentes proteínas VP2 y VP6 expresadas de los diferentes grupos de RV	<b>72</b>
<b>Tabla 6.</b> Expresión de las proteínas VP2-VP6 y formación de ensamblados vDLP a nivel intracelular y extracelular	<b>82</b>
<b>Tabla 7.</b> Análisis de los radios encontrados en las reconstrucciones obtenidas de la DLP de RVA y las vDLP de RVA, RVD y RVI	<b>88</b>

<b>Tabla 8.</b> Alineamiento estructural y análisis (Dali) de las vDLP de RVA, RVD y RVI	<b>90</b>
<b>Tabla 9.</b> Regiones con mayor variabilidad estructural entre monómeros VP2 y VP6 de RVA y RVD	<b>91</b>
<b>Tabla 10.</b> Regiones con mayor variabilidad estructural entre monómeros VP2 y VP6 de RVA y RVI	<b>94</b>
<b>Tabla 11.</b> Volumen de la cápsida ocupado por los genomas y proteínas estructurales VP1 y VP3 de RVA, RVD y RVI	<b>110</b>
<b>Tabla 12.</b> Análisis de la carga del extremo N-terminal de VP2 de RVA, RVD y RVI	<b>111</b>

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Segmentos del genoma y productos proteicos de la cepa de simio SA11 de RVA	<b>121</b>
<b>Anexo 2.</b> Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7 de las cepas de simio SA11 y RRV de RVA	<b>122</b>
<b>Anexo 3.</b> Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP4 de las cepas de simio SA11 y RRV de RVA	<b>126</b>
<b>Anexo 4.</b> Resolución global de los modelos atómicos de la NTR-TLP, TR-TLP y DLP de SA11 y vDLP de RVA, RVD y RVI	<b>128</b>
<b>Anexo 5.</b> Análisis bioquímico de los extractos celulares tratados con detergentes	<b>129</b>
<b>Anexo 6.</b> Análisis por microscopía negativa por tinción negativa de ensamblados purificados del interior de células H5	<b>130</b>
<b>Anexo 7.</b> Análisis por microscopía negativa por tinción negativa de ensamblados purificados del interior de células Sf9	<b>131</b>
<b>Anexo 8.</b> Análisis de la resolución local de los mapas 3D obtenidos de la DLP y vDLP de RVA	<b>132</b>
<b>Anexo 9.</b> Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2 de la cepa de referencia de RVA y RVD	<b>133</b>
<b>Anexo 10.</b> Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2 de la cepa de referencia de RVA y RVI	<b>135</b>

<b>Anexo 11.</b> Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP6 de la cepa de referencia de RVA y RVD	<b>137</b>
<b>Anexo 12.</b> Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP6 de la cepa de referencia de RVA y RVI	<b>138</b>
<b>Anexo 13.</b> Análisis filogenético de la proteína VP2 (1-773 aa) y VP6 (1-378 aa) de todas las especies de rotavirus (RVA-RVJ)	<b>139</b>

## ABSTRACT

Rotavirus (RV) is the leading cause of severe gastroenteritis with dehydration in children under 5 years of age and causes ~ 590 million infections per year in all age groups. RV is classified into 10 different species (A-J) of which RV A (RVA), B, C and H infect humans and animals. The rest of the species have only been found in animals. Due to the difficulty in adapting other species to *in vitro* growth, only structural information is available for the RVA particle.

The RV infective particle has three concentric protein layers from which the spikes are projected. Rotavirus infectivity depends on the activation of viral particles by spike proteolysis through trypsin-like proteases. Although it has been described how the entry into the cell is mediated by a conformational change in the spike, the molecular mechanisms underlying this proteolytic activation process are unknown. Using three-dimensional cryoelectron microscopy (cryoEM) we have resolved the structure of the RV infective particle of group A before and after proteolytic activation at 3.4 and 3.5 Å resolution, respectively. Despite the low occupancy and high flexibility of the spike, we have built an atomic model of the non-activated and activated spikes by combining various computational methods. The resolved structures show that the conformation of the non-proteolyzed spike is conditioned and limited by the position of the loops that surround its structure and that join the lectin domains that form the head of the spike with its body. The proteolysis of these loops breaks this structural limitation allowing the transformation of the spike to a competent state to make the necessary conformational changes to penetrate the cell membrane.

As an alternative, to characterize structurally non-cultivable species of RV, the heterologous expression system with recombinant baculoviruses has been used for the production and purification of virus-like particles (VLP) of the different groups of RV. The structural comparison between native double-layer RVA particles (DLP) and their corresponding VLP (vDLP) shows great structural similarity. However, the absence of the genome and the polymerase complexes slightly alters the size and stability of the particle. The high yield obtained in the VLP production and the high structural preservation in purified vDLP of RVD and RVI have allowed their analysis by cryoEM and the construction of their atomic models. RVA and RVD belong to the same phylogenetic clade and the structural comparison of their VP2 and VP6 proteins shows that there is a high degree of similarity between them, except for the contact loops between the monomers of the inner layer of the vDLP and the apical loops of the outer layer. RVI belongs to another clade, which is reflected in differences throughout the structure in both proteins.

The characterization of the structural variation within the RV genus provides us a solid base to approach the study of different essential aspects in the fight against RV, such as viral tropism or the design of antiviral strategies

## RESUMEN

Rotavirus (RV) es la principal causa de gastroenteritis grave con deshidratación en niños menores de 5 años y causa alrededor de 590 millones de infecciones al año en todos los grupos de edad. RV se clasifica en 10 especies diferentes (A-J) de las cuales RV A (RVA), B, C y H infectan humanos y animales. El resto de las especies sólo se han encontrado en animales. Únicamente se cuenta con información estructural a nivel atómico de la partícula de RVA, debido a la dificultad para la adaptación al crecimiento *in vitro* de las otras especies.

La partícula infectiva de RV presenta tres capas de proteína concéntricas de las que se proyectan espículas. La infectividad de RV depende de la activación de las partículas virales mediante la proteólisis de la espícula llevada a cabo por proteasas similares a la tripsina. Aunque se ha descrito cómo la entrada en la célula está mediada por una serie de cambios conformacionales llevados a cabo por la espícula, se desconoce el mecanismo molecular subyacente al proceso de activación proteolítica. Mediante criomicroscopía electrónica tridimensional (crioME) hemos resuelto la estructura de la partícula infectiva de RV del grupo A pre y post activación proteolítica a 3.4 y 3.5 Å de resolución, respectivamente. A pesar de la baja ocupancia y la elevada flexibilidad de la espícula, hemos conseguido construir un modelo atómico de las partículas no activada y activada mediante la combinación de diversos métodos computacionales. Las estructuras resueltas muestran que la conformación de la espícula no proteolizada está condicionada y limitada por la posición de los bucles que rodean su estructura y que unen los dominios lectina que forman la cabeza de la espícula con el cuerpo de ésta. La proteólisis de estos bucles rompería esta limitación estructural permitiendo la transformando de la espícula a un estado competente para realizar los cambios conformacionales necesarios para penetrar la membrana celular. Como alternativa para poder caracterizar estructuralmente especies no cultivables de RV se ha empleado el sistema de expresión con baculovirus recombinantes para la producción y purificación de pseudopartículas virales (VLP) de los diferentes grupos de RV. La comparación estructural entre partículas de RVA de doble capa (DLP) nativas y sus correspondientes VLP (vDLP) muestra su similitud estructural. Sin embargo, la ausencia del genoma y de los complejos polimerasa altera ligeramente el tamaño y estabilidad de la partícula. El alto rendimiento obtenido en la producción de VLP y la elevada preservación estructural en las vDLP purificadas de RVD y RVI han permitido su análisis mediante crioME y la construcción de sus modelos atómicos. RVA y RVD pertenecen a un mismo clado filogenético y la comparación estructural de sus proteínas VP2 y VP6 muestra que existe una gran similitud entre ellas, a excepción de los bucles de contacto entre monómeros de la capa interna de la vDLP y los bucles apicales de la capa externa. RVI pertenece a otro clado, lo que se refleja en diferencias a lo largo de toda la estructura en ambas proteínas.

La caracterización de la variación estructural dentro del género RV nos proporciona una sólida base con la que abordar el estudio de aspectos tan esenciales en la lucha contra RV como el tropismo viral o el diseño de estrategias antivirales.

## *Introducción*

---

## 1. Introducción

Los rotavirus (RV) se descubrieron en 1973 y fueron identificados como los principales agentes causantes de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años (Bishop et al., 1973; Flewett et al., 1974). RV pertenece a la familia *Reoviridae* (King A. et al., 2011) y, junto con el virus de la Lengua Azul (*Bluetongue virus*) y el ortoreovirus de mamíferos, es uno de los principales modelos de esta familia. Su transmisión se produce por vía fecal-oral y, globalmente, se estiman alrededor de 591 millones de infecciones anuales. El desarrollo de vacunas frente a RV ha permitido su introducción en diferentes programas nacionales de inmunización en 79 países, pero RV todavía es responsable de 230,000 muertes anuales, la mayoría en países en vías de desarrollo. RV tiene un fuerte impacto económico en los sistemas de salud de los países desarrollados causando 5.5 millones de infecciones y 1.6 millones de hospitalizaciones entre niños menores de 5 años en 2016 (Troeger et al., 2017).

Muchas de las infecciones por RV desarrolladas en niños pequeños cursan de forma asintomática haciendo que estos puedan diseminar el virus dentro de su comunidad (Ramani S., et al., 2010). Igualmente, las infecciones en niños mayores y adultos también contribuyen a la rápida propagación a nivel global (Anderson & Weber, 2004). Por ello, la vacunación es un paso esencial en la prevención de la patología grave derivada de la infección y en la limitación de la diseminación del virus.

En 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó la inclusión de vacunas contra RV en los programas nacionales de inmunización de todos los países, especialmente en aquellos donde las muertes por diarrea son responsables de más del 10% de la mortalidad en niños menores de 5 años (Troeger et al., 2017). La reciente introducción de dos vacunas con virus vivos atenuados (RotaReq y Rotarix) en programas de vacunación infantil ha sido muy eficaz para reducir la incidencia y mortalidad por RV (Burnett E. et al., 2017). Además de estas, existen otras vacunas, utilizadas en ciertos países en vías de desarrollo, cuyo uso podría contribuir a la disminución de la mortalidad en niños (Bergman et al., 2021; Burke et al., 2019; Burnett et al., 2018; Jonesteller et al., 2017; Sadiq et al., 2018).

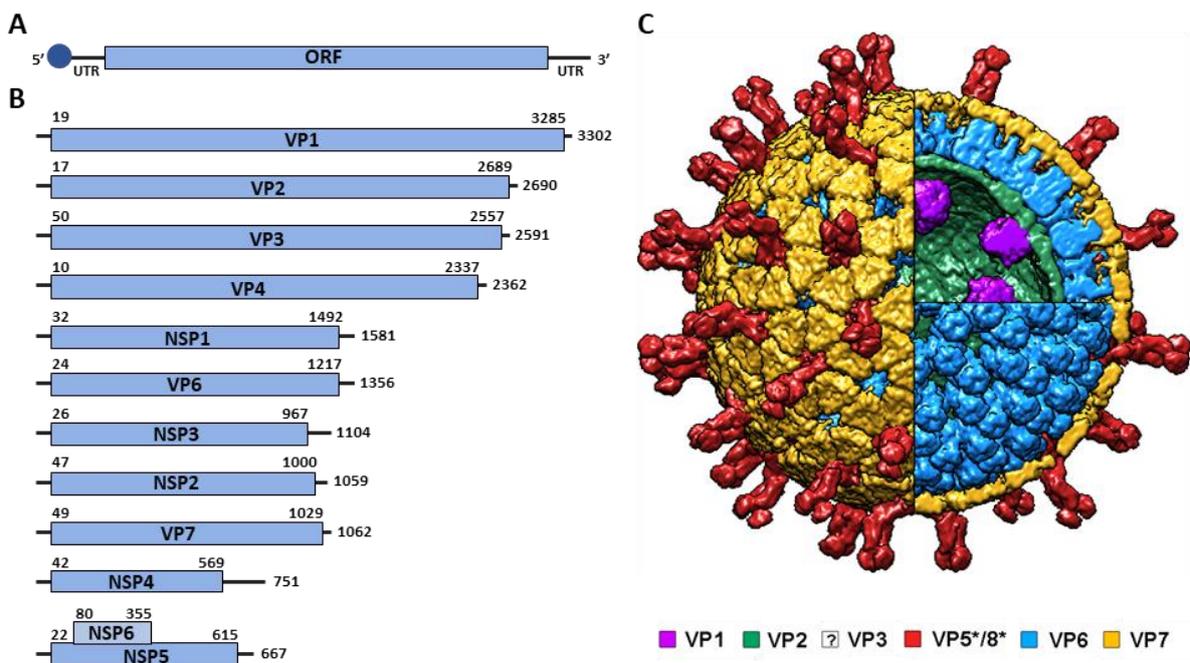
Las vacunas son una útil y poderosa herramienta en la lucha contra los efectos adversos más graves de la infección por RV, pero la presencia y aparición de nuevas cepas que escapan a la protección ofrecida por estas vacunas (Kirkwood, 2010; John T Patton, 2012), así como la variabilidad y fluctuación en la distribución de genotipos a nivel mundial (Santos & Hoshino, 2005) hacen necesaria una continua vigilancia de este patógeno y un constante desarrollo de nuevas vacunas. Por otro lado, la deficiente respuesta a las vacunas en personas inmunocomprometidas (Chiu et al., 2019) requiere el desarrollo de otras terapias alternativas como compuestos antivirales. Por estas razones, y por su papel como modelo de la familia *Reoviridae*, el estudio de RV continúa siendo de gran relevancia.

## 1.1 Organización genómica de rotavirus

La mayoría de los datos acerca de RV proviene de los estudios realizados con la especie A, entre los que el RV de simio SA11 (*Simian Agent-11*) representa un paradigma para otros virus dentro del género (Attoui et al., 2012). Los datos a los que nos referimos en sucesivos apartados hacen referencia a la estirpe SA11 y RRV (*Rhesus monkey rotavirus*).

RV tiene un genoma segmentado de ~18,500 pb formado por 11 moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) (M. K. Estes & Greenberg, 2013). Cada segmento de RNA de polaridad positiva ((+)ssRNA) contiene una fase lectura abierta (*open reading frame*, ORF) flanqueada por dos regiones no codificantes (*untranslated region*, UTR) en los extremos 5' y 3'. Estos (+)ssRNA actúan como RNA mensajeros (mRNA) y como precursores de los segmentos de doble cadena para formar el genoma viral y, además, presentan una estructura *cap* de tipo 1 en el extremo 5' (Fig. 1A), características compartidas con los genomas segmentados de otros miembros de la familia *Reoviridae* (p. ej., reovirus, virus de la poliedrosis citoplasmática, orbivirus) así como de otras familias de virus (*Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* y *Bunyaviridae*).

Todos los segmentos que forman el genoma (Fig. 1B) son monocistrónicos excepto el segmento 11 que contiene dos ORF solapantes a partir de las cuales se expresan dos proteínas diferentes. RV codifica 12



**Figura 1. Organización genómica de RV y estructura de su partícula viral.** (A) Representación esquemática de un segmento del genoma de RV. Se indican las regiones no codificantes (UTR), la fase lectura que codifica la proteína viral y la estructura *cap* de tipo 1 en el extremo 5' (círculo azul). (B) Estructura del genoma segmentado del RV de simio SA11. Se indican (en nucleótidos) el tamaño de los segmentos y las posiciones de inicio y fin de las fases de lectura abierta. Las líneas en los extremos 5' y 3' representan las UTR. Figura adaptada de (M. K. Estes & Greenberg, 2013). (C) Representación de la partícula viral del RVA. El código de color indica cada una de las proteínas estructurales. Figura adaptada de (Rodríguez & Luque, 2019).

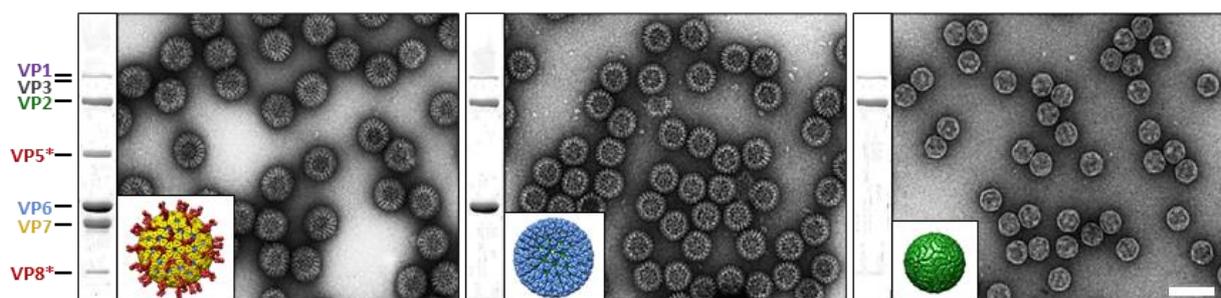
proteínas, 6 de ellas estructurales (VP), VP1-VP6, y las otras 6 no estructurales (NSP), NSP1-NSP6 (Fig.1B, 1C). La secuencia de la ORF que codifica NSP6 se encuentra conservada en la mayoría de las cepas, aunque su expresión se ha demostrado sólo para unas pocas y su función no está claramente definida (Hu et al., 2012). La relación de todas las proteínas virales y sus funciones principales viene indicada en el Anexo 1.

## 1.2 Estructura de la partícula de rotavirus

La partícula viral madura e infectiva de RV tiene una estructura icosaédrica de aproximadamente 100 nm de diámetro (Fig. 1C, Fig. 2) que se asemeja a una rueda cuando se observa por microscopía electrónica (ME) (Crawford et al., 2017; Settembre et al., 2011). El nombre dado a estas partículas fue acuñado en base a su morfología (Flewett et al., 1974): ‘rotavirus’, del latín *rota* que significa “rueda”. La partícula viral se organiza en tres capas de proteína concéntricas que encierran el genoma. La capa más interna del virión está formada por 120 moléculas de VP2 que forman dímeros organizados en una arquitectura T=1. Dentro se encuentra el genoma viral y la maquinaria transcripcional, formada por 12 copias de la proteína VP1 y un número no definido de copias de la proteína VP3 (Estrozi et al., 2013). La capa interna junto con la maquinaria transcripcional y el genoma forman la SLP (*single-layered particle*) o *core*, de 25-30 nm de diámetro (Fig. 2, panel derecho). Sobre ella se ensambla una capa de unos 15 nm de espesor formada por 260 trímeros de VP6 organizados con simetría icosaédrica T=13I, dando lugar a la partícula de doble capa o DLP (*double-layered particle*), de 70 nm de diámetro. Estas partículas también se denominan como ‘rugosas’ porque en su superficie se pueden observar las subunidades triméricas que se proyectan hacia afuera de la partícula (Fig. 2, panel central). Las DLP son transcripcionalmente activas, e infectivas si se transfectan en cultivos celulares (Bass et al., 1992). Sobre esta DLP se dispone, en fase con VP6, una capa de ~3 nm de grosor formada por 260 trímeros de VP7, desde la que se proyectan trímeros de VP4 (~15 nm hacia el exterior) que forman las espículas alrededor de toda la partícula. La adición de estas dos proteínas genera la partícula de triple capa o TLP (*triple-layered particle*) que es la partícula infectiva (Fig. 2, panel izquierdo) (Desselberger, 2014).

La organización de las subunidades que componen las diferentes capas da lugar a la formación de depresiones en la estructura de la partícula denominadas canales. RV presenta 132 canales de distinto tamaño alrededor de la partícula que se clasifican según su posición con respecto a los ejes de simetría icosaédrica (Desselberger, 2014; Mathieu et al., 2001; B. V.Venkataram Prasad et al., 1988). Los viriones contienen 12 canales de clase I, localizados en los ejes de simetría 5, 60 canales de clase II en cada una de las posiciones pentavalentes que rodean los ejes de simetría 5, y 60 canales de clase III en las seis posiciones coordinadas que rodean los ejes de simetría 3 (Jayaram et al., 2004). Estos canales participan en diferentes funciones del ciclo viral. Los canales de tipo I constituyen los lugares por los que las cadenas (+)ssRNA salen de la partícula y donde se encuentran los complejos enzimáticos

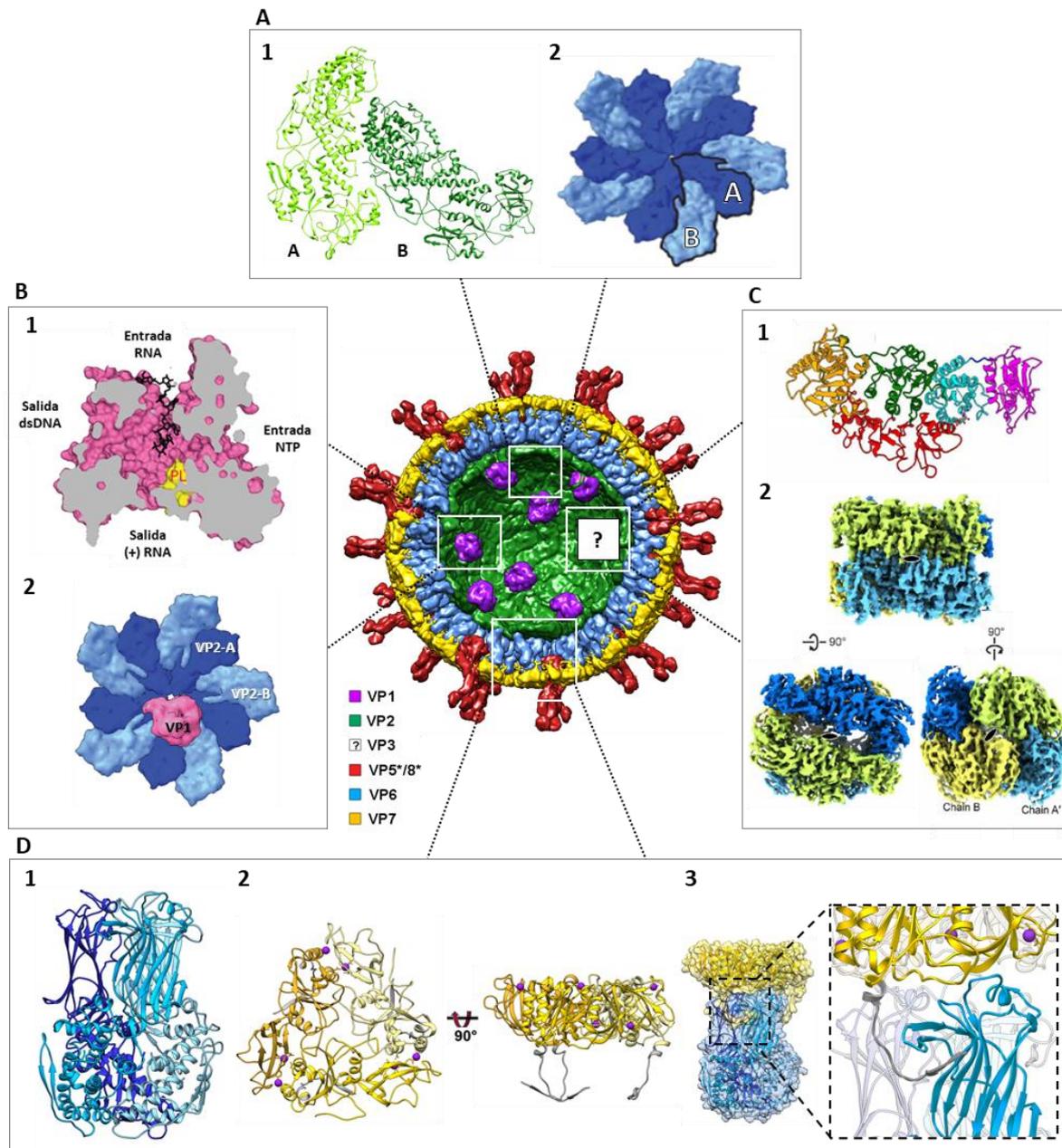
compuestos por VP1 y VP3 (Jayaram et al., 2004). Los canales de tipo II constituyen los sitios de anclaje de las espículas de la partícula de RV infectiva (Desselberger, 2014).



**Figura 2. Composición y estructura de la TLP y de las subpartículas virales de RV.** Se muestran geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y ME por tinción negativa de TLP (panel izquierdo), DLP (panel central) y SLP (panel derecho). Se indican las posiciones de las bandas asociadas a cada proteína (VP). La barra representa 100 nm. Figura adaptada de (Jiménez-Zaragoza et al., 2018).

La proteína **VP2** (102 kDa) forma la cápsida proteica de la partícula SLP y se organiza en una arquitectura T=1 que una vez ensamblada nunca se desensamblará durante el ciclo de infección (Attoui et al., 2012; Mertens, 2004). Cada unidad asimétrica en la SLP está formada por un dímero de VP2 (VP2A, VP2B) (Fig. 3A.1). Cinco monómeros de VP2A convergen alrededor del eje de simetría 5 formando un complejo en forma de estrella, y cinco monómeros VP2B adicionales se ensamblan entre sus puntas formando una estructura decamérica (Figura 3A.2). De forma global, la estructura de cada monómero ha sido descrita en tres dominios (Desselberger, 2014; McClain et al., 2010): el dominio apical que comprende la región próxima al eje de simetría 5 (residuos 309-596), el dominio dimérico (residuos 698-831) que se encuentra en el extremo opuesto del monómero y contacta con el dominio dimérico del monómero adyacente y, por último, el dominio central (residuos 1-308, 597-697, 832-882) que se localiza entre los dos anteriores. VP2 ejerce un papel en el reclutamiento de VP1 y la activación de la replicación, en el que cada decámero de VP2 se asocia a una molécula de VP1 (Estrozi et al., 2013; J T Patton et al., 1997; Trask et al., 2012). Además, VP2 tiene afinidad por el ssRNA y dsRNA (Boyle & Holmes, 1986) (Labbe et al., 1994) e interacciona con las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 (Berois et al., 2003; Buttafuoco et al., 2020; Vende et al., 2003).

La proteína estructural **VP1** (125 kDa) es la RNA polimerasa viral dependiente de RNA (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRp) que cataliza la síntesis de RNA en el interior de las subpartículas virales (J. Lawton et al., 2000). VP1 es una proteína globular compacta de ~70 Å de diámetro que exhibe una arquitectura de ‘mano derecha’ (dedos-palma-pulgar), comúnmente encontrada en otros reovirus y otras RdRp (Tao et al., 2002; Te Velthuis, 2014). Está formada por tres dominios: un dominio N-terminal, un dominio de polimerasa y un dominio C-terminal (Lu et al., 2008). Los dominios N- y C-terminal forman una cavidad interior donde se encuentra el centro catalítico (Fig. 3B.1).



**Figura 3. Estructura de la partícula de RV.** Representación del modelo atómico de la partícula TLP de RVA (imagen central). El código de color indica cada una de las proteínas estructurales. **(A) A1.** Modelo atómico del dímero de VP2 (PDB 3KZ4) donde se indican las cadenas A y B que lo forman. **A2.** Vista de la superficie interna de un decámero de VP2. Los conformeros de VP2, VP2A y VP2B, están representados en azul oscuro y claro, respectivamente. Figura adaptada de (Trask et al., 2012). **(B)** Localización de VP1. **B1.** Estructura de VP1 con (+)ssRNA (PDB-2R7R). Se identifican las funciones de los cuatro túneles que se extienden hasta el gran centro catalítico de VP1. Figura adaptada de (Trask et al., 2012). **B2.** Localización de la polimerasa VP1 en la cara interna del core. **(C)** Reconstrucción y modelo atómico de VP3. **C1.** Organización del dominio modular de la estructura del monómero VP3. **C2.** Estructura criome del tetrámero VP3 (EMD-0632) a lo largo de los ejes de simetría de orden 2. Figura adaptada de (Kumar et al., 2020). **(D)** Estructura de las proteínas estructurales VP6 y VP7. **D1.** modelo atómico de VP6 (PDB: 3KZ4). **D2.** modelo atómico del trímero VP7 (PDB 3GZT), vistas superior (arriba) y lateral (abajo). Dos iones de calcio (magenta) están unidos en la interfaz entre las subunidades de VP7. **D3.** Interacción entre trímeros VP6 y VP7. El trímero VP7 se encuentra sobre VP6 y el contacto entre ellos está mediado por los tres brazos N-terminales de VP7 que sujetan el trímero VP6 formando una cadena  $\beta$  adicional en VP6 (recuadro). Figura adaptada de (Rodríguez & Luque, 2019).

VP1 se localiza en la cara interna de la capa formada por VP2 (Ding et al., 2019; Jenni et al., 2019) en una posición ligeramente descentrada del eje de simetría de orden 5 (en uno de los cinco sitios de unión equivalentes en cada vértice) (Ding et al., 2019; Estrozi et al., 2013; Estrozi & Navaza, 2010; Jenni et al., 2019; Zhang et al., 2003) (Fig. 3B.2).

**VP3** (88 kDa) forma parte del complejo polimerasa junto con VP1 y participa en la generación de cadenas (+)ssRNA maduras. Un grupo de 4 monómeros de VP3 (Fig. 3C.1) se unen para formar un complejo tetramérico estable con una simetría D<sub>2</sub> constituido por dos dímeros antiparalelos (Fig. 3C.2). Además de las actividades guanilil y metiltransferasa (Dayue Chen et al., 1999; M. Liu et al., 1992), VP3 presenta diferentes funciones, como actividad RNA trifosfatasa y RNA helicasa, requeridas para separar las cadenas de dsRNA (Kumar et al., 2020).

**VP6** (45 kDa) es la proteína más abundante del virión, representando alrededor del 51% de la masa proteica total (Mattion NM et al., 1994). 260 trímeros de VP6 se ensamblan sobre VP2 formando la capa intermedia del virión con una estructura T=13I. Las tres subunidades que forman el trímero se organizan alrededor de un eje de simetría 3 *dextro* giro (Fig. 3D.1). Los trímeros de VP6 se disponen en cinco posiciones cuasi-equivalentes, nombradas en función de los ejes de simetría icosaédricos a los que se encuentran asociados (dimérico, D; trimérico, T; próximo a trimérico, T'; pentamérico, P; próximo a pentamérico, P'). Los monómeros que forman el trímero interactúan entre sí y con un ion zinc (Zn<sup>+</sup>) que proporciona una mayor estabilidad a la estructura (Jayaram et al., 2004; Mathieu et al., 2001). VP6 interactúa con otras proteínas estructurales de la partícula. Las interacciones entre VP6 y VP2 son predominantemente hidrófobas (Jayaram et al., 2004). VP6 también interactúa con los extremos amino terminales de los monómeros de VP7 y, posiblemente, con algunos iones que pueden estabilizar la estructura (Jiménez-Zaragoza et al., 2018). Por último, las espículas de VP4 interactúan con VP6 al encontrarse insertadas en los canales de tipo II en cada una de las posiciones pentavalentes que rodean los ejes de simetría 5.

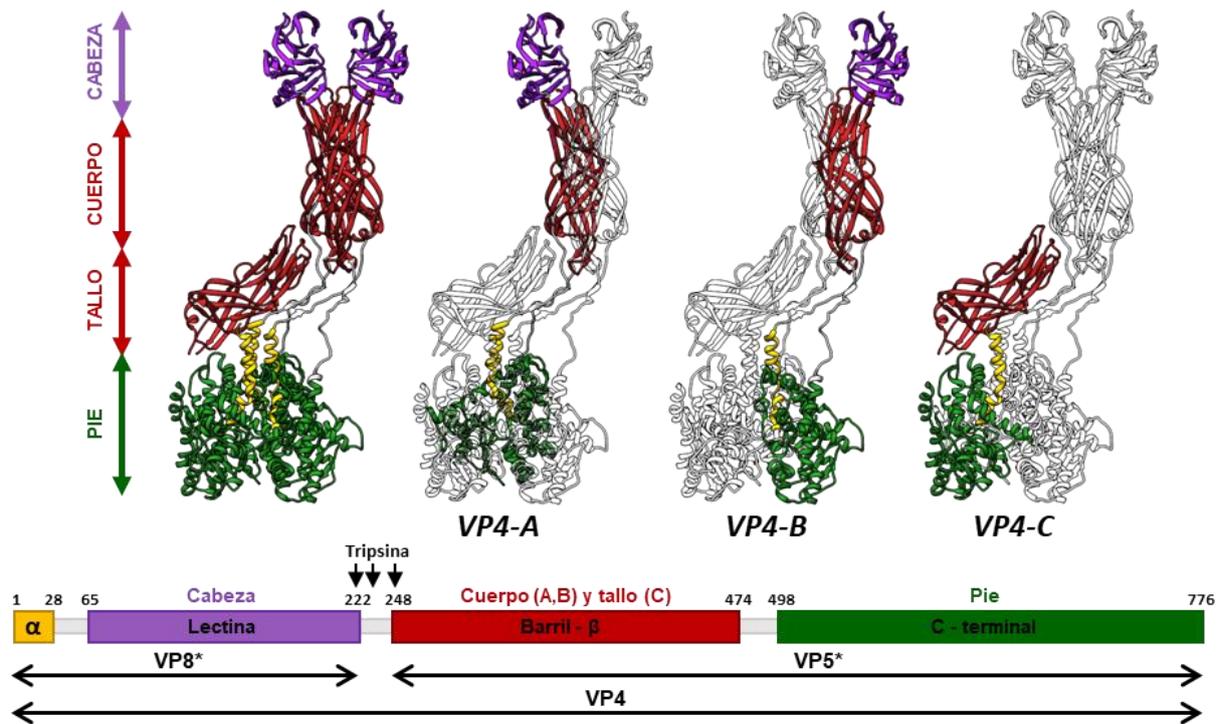
La capa externa de la partícula madura o TLP de RV está formada por 260 trímeros de la glicoproteína **VP7** (37 kDa). Esta se ensambla en trímeros estabilizados por dos iones de calcio (Ca<sup>2+</sup>) ubicados entre cada dos subunidades, por lo que cada trímero contiene seis iones (Aoki et al., 2009) (Fig. 3D.2). La interacción entre las moléculas de VP7 es sensible a los niveles de calcio del medio (Cohen et al., 1979; Gajardo et al., 1997; M C Ruiz et al., 1996) y la presencia de calcio es un requisito para la formación de trímeros de VP7 (P. R. Dormitzer et al., 2000). Concentraciones bajas de calcio, similares a las del citoplasma celular, desencadenan la disociación de los trímeros de VP7 y conducen al desensamblaje de la capa de VP7. El uso de agentes quelantes, empleados para la purificación y obtención de DLP, permite el desensamblaje de la capa de VP7 de partículas maduras (Cohen et al., 1979; P. R. Dormitzer et al., 2000). Como se indicó previamente, los extremos N-terminales de VP7, con forma de 'brazo' o 'gancho', interactúan con los trímeros de VP6 subyacentes y entran en contacto con la zona basal de VP4 (J. Z. Chen et al., 2009; Settembre et al., 2011). Cada uno de los tres brazos del trímero de VP7

forma una cadena  $\beta$  (residuos 58-62) que se extiende bajo la  $\beta$ -lámina del dominio *jelly roll* de VP6 (Figura 3D.3).

La proteína **VP4** forma las espículas de la partícula infectiva. Cada espícula está formada por tres monómeros de la proteína (A, B y C), que se organizan en una estructura trimérica (Fig.4) con una longitud total de 200 Å, que se proyecta unos 120 Å desde la superficie del virus (Sue E. Crawford et al., 2001; Z. Li et al., 2009; Settembre et al., 2011). La espícula es una estructura compleja y polimórfica con elementos triméricos, diméricos y asimétricos. La secuencia de VP4 presenta tres residuos específicos (R231, R241 y R247) cuyos enlaces son susceptibles de ser escindidos por proteasas similares a tripsina (Fig. 4, diagrama estructura primaria). Esta proteólisis permite la escisión de cada cadena de VP4 en dos subproductos, VP8\* (28 kDa, aa 1-247) y VP5\* (60 kDa, aa 248-776) constituyendo el primer paso del ciclo de infección, ya que los viriones no procesados no son infectivos (Rodríguez et al., 2014).

En la base del trímero de VP4 se encuentran los extremos C-terminales de cada una de los tres monómeros, así como los tres dominios  $\alpha$  N-terminal (residuos 1-28), quienes interactúan entre sí formando un **pie** trimérico anclado en los canales de tipo II que rodean las posiciones pentaméricas de la partícula (Fig. 5A) (Rodríguez et al., 2014; Trask & Dormitzer, 2006). Así, las espículas se encuentran rodeadas por dos trímeros P, un trímero P' y un trímero T' de las capas de VP6 y VP7 (Fig. 5A). Los contactos entre el pie de la espícula y VP7 son escasos, principalmente mediados por los brazos del extremo N-terminal de VP7. El ensamblaje de la capa de VP7 sobre VP6 restringe el diámetro de la cavidad por encima de la base de la espícula anclándola en la partícula (Settembre et al., 2011; Trask & Dormitzer, 2006). La región de la espícula que sobresale, denominada **tallo** (Fig. 4), no mantiene la simetría trimérica local observada en el pie, y está formada por la región barril- $\beta$  de VP5\* de la subunidad C que se inserta en una región entre los trímeros D y P' de VP7, interactuando con sus subunidades adyacentes. Las regiones barril- $\beta$  de las subunidades A y B forman el **cuerpo** de la espícula, con simetría dimérica, sobre el que se asientan los dominios lectina VP8\* de las subunidades A y B, que forman la **cabeza** dimérica (Fig. 4).

El dominio lectina VP8\* de la subunidad C no se ha encontrado en ninguna reconstrucción de TLP tratadas con tripsina y se presume que se disocia de la partícula después de su procesamiento proteolítico (Herrmann et al., 2021; Z. Li et al., 2009; B. V.Venkataram Prasad et al., 1988; Settembre et al., 2011). Los dominios lectina son responsables de la unión a glicanos de la superficie celular y se disponen de tal forma que cubren tres bucles hidrofóbicos (residuos 283-289, 330-337 y 387-395) localizados en el extremo más distal de los dominios barril- $\beta$  que forman el cuerpo de la espícula (subunidades A y B) (Fig. 4). Los bucles hidrofóbicos del barril- $\beta$  del tallo (subunidad C) están escondidos en el extremo proximal del cuerpo (I. S. Kim et al., 2010).



**Figura 4. Estructura atómica de la espícula de rotavirus.** (Panel superior) Representación del modelo atómico (PDB 4VZQ) de VP4 tripsinizada. Cada dominio se representa siguiendo el mismo patrón de color: pie (verde), tallo (rojo), cuerpo (rojo) y cabeza (violeta). Se indican de forma resaltada cada una de las subunidades de VP4 (A, B, C). El dominio de lectina de VP4-C no está presente en la estructura. Figura adaptada de (Rodríguez & Luque, 2019). (Panel inferior) Diagrama de la estructura primaria y organización de dominios de VP4: dominios  $\alpha$  (amarillo), lectina (magenta), barril- $\beta$  (rojo) y C-terminal (verde). Se indican los residuos que delimitan los dominios y los sitios de escisión de tripsina.

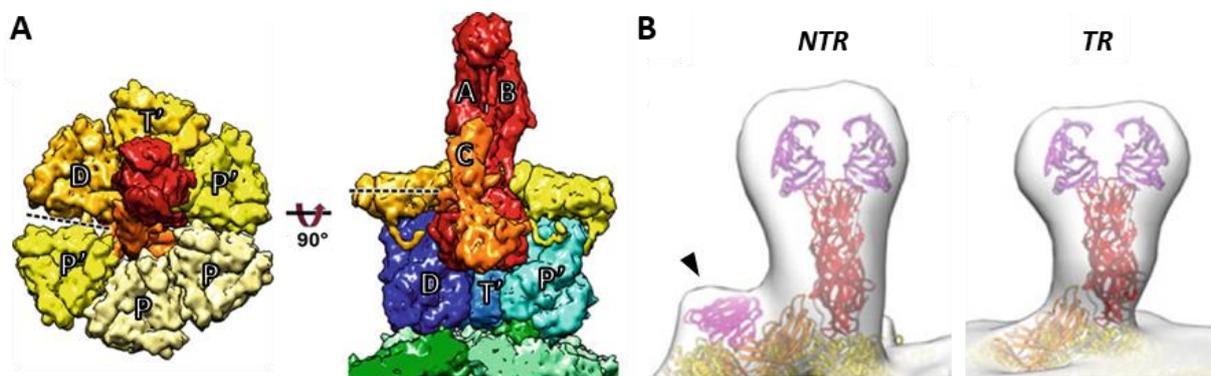
### 1.3 Activación de la espícula de RV y cambios estructurales asociados

Para que la partícula de RV sea infectiva, la proteína VP4 debe ser procesada a través de una cascada de reacciones ordenadas, llevadas a cabo por proteasas similares a tripsina en el lumen intestinal del huésped, en las que VP4 se escinde por tres residuos específicos (R231, R241, R247) generando dos subproductos VP8\* y VP5\* (S. M. Clark et al., 1981; M. K. Estes & Greenberg, 2013; D. Y. Graham & Estes, 1980; Ludert et al., 1996). Los viriones no activados pueden interactuar con las células e incluso entrar en ellas dando lugar a infecciones no productivas (Sue E. Crawford et al., 2001; Komoto et al., 2011; Lopez & Arias, 2006; Rodríguez et al., 2014), pero es necesario que VP4 sea proteolizada en sus fragmentos VP5\* y VP8\* para que la infección sea productiva, tanto *in vivo* como *in vitro* (Arias et al., 1996; Gilbert & Greenberg, 1998; D. Y. Graham & Estes, 1980; Rodríguez et al., 2014).

Inicialmente se hipotetizó que la escisión por tripsina aseguraba una correcta conformación y ensamblaje de las espículas (Sue E. Crawford et al., 2001), pero el estudio (Rodríguez et al., 2014) de reconstrucciones tridimensionales (3DR) generadas a partir de datos de criome en viriones tratados (TR-TLP) y no tratados (NTR-TLP) con tripsina muestra que el procesamiento proteolítico no implica grandes cambios conformacionales sobre la estructura global de partícula. El análisis por criotomografía electrónica (crioTE) de espículas tripsinizadas (espículas TR) y no tripsinizadas (espículas NTR),

permitió caracterizar estructuralmente los diferentes dominios presentes, incluyendo el dominio lectina de la subunidad C, no observado mediante criME (Fig. 5B). En base a estos datos, se ha hipotetizado que el hecho de encontrar mínimas variaciones en la estructura de espículas inactivadas y activadas, sugiere que la espícula se procesa proteolíticamente, no para lograr una mayor estabilidad estructural, sino para alcanzar la competencia necesaria para realizar los cambios conformacionales necesarios para la entrada en la célula diana (Herrmann et al., 2021; Rodríguez et al., 2014).

Sin embargo, se desconocen las diferencias estructurales a nivel atómico provocadas por este mecanismo. La estructura de la espícula presenta una conformación asimétrica, tanto antes como después de su proteólisis. Tras la escisión en los residuos mencionados, la subunidad C libera todo el dominio VP8\* excepto su región N-terminal (Fig. 4, VP4-C), mientras que las subunidades A y B mantienen sus fragmentos VP8\* intactos asociados a los dominios barril- $\beta$  de los fragmentos VP5\* por interacciones no covalentes (Fig. 4, VP4-A y B).

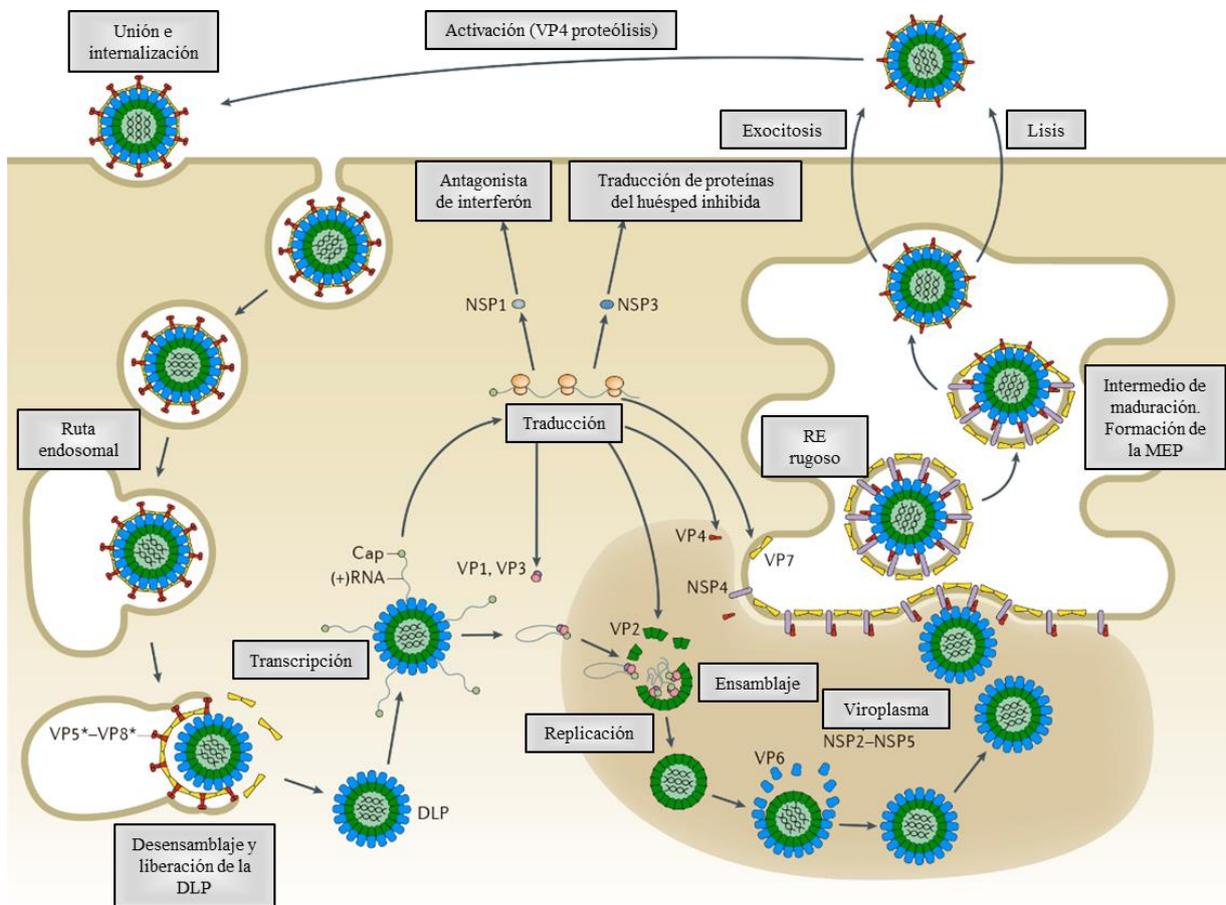


**Figura 5. Representación de la espícula y su entorno. Estructura de las espículas en TR- y NTR-TLP.** (A) Vista superior (derecha) y lateral (izquierda) de la espícula anclada en uno de los canales de tipo II de la partícula. Se muestra su interacción con los trímeros adyacentes de VP7 (panel derecho) y VP6 (panel izquierdo). VP2 está representado en diferentes niveles de verde, VP6 en azul, VP7 en amarillo y VP4 en rojo. Se indican los conformeros de VP4 (A, B, C) y los capsómeros triméricos VP6/VP7 (P, P', D, T'). (B) Modelos atómicos VP4 y VP7 (PDB 4V7Q) representados en los subvolúmenes obtenidos por criote de NTR-TLP (EMD-2579) y TR-TLP (EMD-2580). La punta de flecha señala la densidad en la base del tallo de la espícula NTR compatible con el dominio lectina de la subunidad C. Figura adaptada de (Settembre et al., 2011) y (Rodríguez & Luque, 2019).

#### 1.4 Morfogénesis. Ciclo viral

Una vez se lleva a cabo la activación de las partículas virales mediante la digestión de la proteína VP4 por proteasas en el lumen intestinal del huésped, la infección de RV continúa con la unión de los viriones a receptores celulares glicanos en la superficie celular mediante VP8\* (Rodríguez & Luque, 2019). Después de la unión inicial, VP7 y el dominio VP5\* de VP4 interactúan con diferentes moléculas presentes en la superficie celular que actúan como correceptores (Baker & Prasad, 2010; Desselberger, 2014; M. K. Estes & Greenberg, 2013; Lopez & Arias, 2006; S. López & Arias, 2004). VP5\* es capaz de interactuar con la proteína Hsc70 y la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , mientras VP7 reconoce las integrinas  $\alpha \beta 3$  y  $\alpha \beta 2$  (K. L. Graham et al., 2003; Guerrero et al., 2000, 2002; Zárate et al., 2000). Después de la unión

inicial a la célula se da su internalización celular. Diferentes autores han propuesto distintos mecanismos para el proceso de entrada viral. El primer mecanismo propuesto sugería que la entrada ocurría mediante penetración directa a través de la membrana celular (Desselberger, 2014; M. K. Estes & Greenberg, 2013; Kaljot et al., 1988; H. Suzuki et al., 1985, 1986; H Suzuki et al., 1984). Hallazgos más recientes sugieren que el virus puede entrar en las células por endocitosis mediada por receptores de membrana (Fig. 6) y seguir diferentes rutas endocíticas de entrada que convergen en el sistema de endosomas: endocitosis mediada por clatrina, independiente de clatrina y caveolina, o dependiente de colesterol y dinamina, entre otras (Diaz-Salinas et al., 2014; Silva-Ayala et al., 2013; Wolf et al., 2012). Una vez formados los endosomas tempranos, la disminución de la concentración de calcio dentro de la vesícula endocítica, junto con una serie de cambios conformacionales producidos en la espícula (Herrmann et al., 2021) llevarían al desensamblaje de la capa de VP7 y VP4 de la partícula (Marie Christine Ruiz et al., 1997) y a la liberación de las DLP al citoplasma celular.



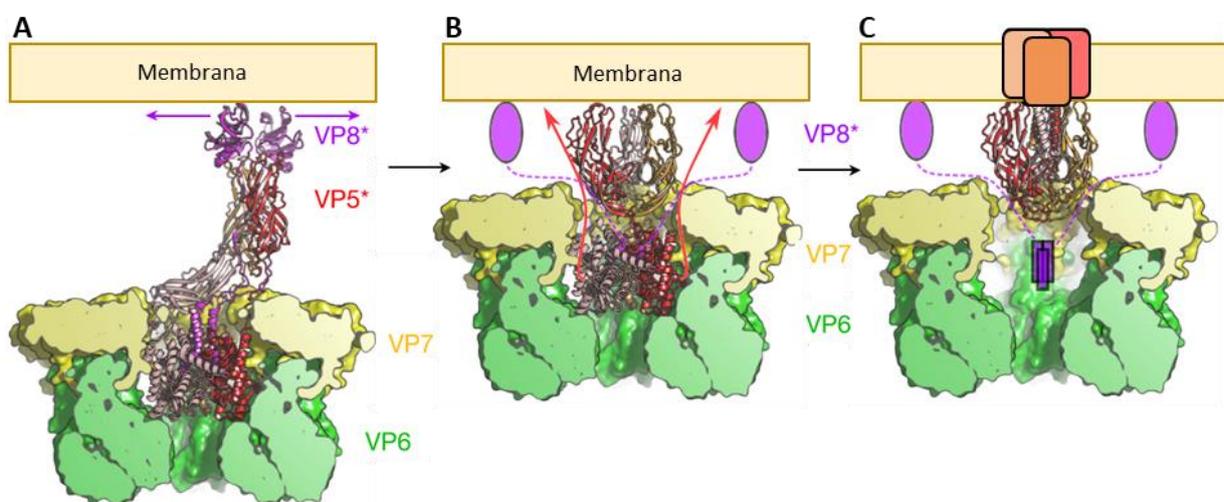
**Figura 6. El ciclo de replicación de RV.** Figura adaptada de (Sue E Crawford et al., 2017).

Recientemente, se ha propuesto un modelo para el proceso de penetración de la membrana del endosoma en el que las proteínas que componen la espícula jugarían un papel fundamental (Fig. 7) (Abdelhakim et al., 2014; Herrmann et al., 2021; I. S. Kim et al., 2010; Tihova et al., 2001; Trask et al.,

2010). Este mecanismo se asemejaría al proceso realizado por las proteínas de fusión de virus envueltos cuyos cambios conformacionales aportan la energía necesaria para ruptura de la membrana y entrada celular (Battles & McLellan, 2019; Benton et al., 2020; P. Dormitzer et al., 2004; Stephen C. Harrison, 2008; Herrmann et al., 2021; Jackson et al., 2022). En este modelo (Abdelhakim et al., 2014; Herrmann et al., 2021), la unión inicial a la célula huésped se produce a través de la interacción de los dominios de lectina VP8\* con glicanos de superficie (Fig. 7A). Esta interacción es necesaria para un primer cambio conformacional en el que los dominios de lectina se separan del cuerpo de la espícula en un desplazamiento lateral y exponen los bucles hidrofóbicos de VP5\* de los dominios barril- $\beta$  del cuerpo y del tallo que interactúan con la membrana (Fig. 7B). Los dominios lectina permanecerán unidos a la partícula durante todo el proceso por el segmento N-terminal de VP8\* a través del bucle  $\alpha 2$ - $\beta 1$  (residuos 28-64).

La liberación de VP5\* permite su plegamiento desde una conformación vertical a una invertida mediante el giro hacia afuera del barril- $\beta$  de VP5\* del tallo y la formación de un cuerpo trimérico (Fig. 7B). Posteriormente, tendría lugar un cambio conformacional en el que el segmento  $\eta 3$ - $\alpha 7$  (residuos 491-525), que forma dos  $\alpha$ -hélices cortas en el pie de la espícula, se replegaría a través del nuevo cuerpo trimérico y se proyectaría como 3 largas  $\alpha$ -hélices superenrolladas (*coiled-coil*).

Esto promovería el despliegue del pie de la espícula y su inserción en la membrana celular (Fig. 7C), la cual desestabilizaría la membrana y promovería la liberación de la partícula en el citoplasma. En su conformación inversa, VP5\* permanece unida al virión a través de contactos con tres de las seis subunidades de VP7 que lo rodean.



**Figura 7. Representación esquemática de los reordenamientos estructurales de la espícula durante la entrada de RV.** VP6 está representado en color verde y VP7 en amarillo. Las subunidades en los modelos atómicos de VP4 se muestran en representación de cinta y coloreadas: VP5\* en rojo, naranja, salmón y VP8\* en magenta. (A) La activación con tripsina escinde VP4 en los péptidos VP5\* y VP8\* que preparan la espícula para cambios conformacionales posteriores (B) y (C). Figura adaptada de (Herrmann et al., 2021).

Después de la entrada en las células, las DLP liberadas en el citoplasma (Salgado et al., 2017) y transcripcionalmente activas, inician la transcripción primaria (J. A. Lawton et al., 1997) y la consiguiente expresión de las proteínas virales. Los (+)ssRNA sintetizados actúan como mRNA en la generación de las distintas proteínas virales y como moldes para la síntesis del (-)ssRNA durante la replicación del genoma. Las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6, junto con las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 son reclutadas junto con los ssRNA virales a unas regiones citoplasmáticas electrodensas no membranosas, conocidas como viroplasma, donde se produce la replicación y formación de las nuevas subpartículas virales, SLP y DLP (L. Hu, Crawford, Czako, et al., 2012; John T. Patton et al., 2006; Silvestri et al., 2004). Las proteínas NSP2 y NSP5 son claves en este proceso ya que la expresión de estas dos proteínas por sí sola es suficiente para inducir la formación de estructuras similares a viroplasma en el citoplasma celular, capaces de iniciar el reclutamiento de las proteínas virales (Fabbretti et al., 1999). Diferentes estudios sugieren que el ensamblaje de las SLP se inicia mediante la interacción de VP1 y VP3 con los (+)ssRNA presentes en los viroplasma, formando un *pre-core* (Gallegos & Patton, 1989; B. V.V. Prasad et al., 1996) al que se uniría VP2 e iniciaría la síntesis de cadenas (-)ssRNA (J. T. Patton & Gallegos, 1990; Silvestri et al., 2004). Tras la formación de las SLP, se presupone que las DLP se ensamblan en la periferia del viroplasma, donde existe una alta concentración de VP6 (González et al., 2000). Estas DLP pueden permanecer en los viroplasma produciendo (+)ssRNA o pasar a la siguiente etapa de maduración de la partícula.

Las últimas etapas del ensamblaje viral tienen lugar en el retículo endoplásmico (RE), en contraste con el resto de los miembros de la familia *Reoviridae*, cuya morfogénesis es puramente citoplasmática. Una vez ensambladas las DLP, aunque no se conoce el mecanismo específico de formación y salida de estas del viroplasma (Trask et al., 2012), las partículas se dirigen a la membrana del RE donde se encuentra la proteína NSP4 que actúa como un receptor intracelular para VP6 (T. López et al., 2005; O'Brien et al., 2000). El extremo C-terminal de NSP4 se une a VP6 permitiendo el proceso de gemación de la DLP al RE y la generación de un intermedio de maduración con una envuelta lipídica transitoria, denominado MEP (*Membrane Enveloped Particle*). La función que desempeña la formación de estas MEP así como los mecanismos que median la pérdida posterior de esta membrana lipídica durante el proceso de maduración de las partículas no se conocen con exactitud. NSP4 interacciona también con VP4 (Maass & Atkinson, 1990) favoreciendo las interacciones DLP-VP4, previas al ensamblaje de la proteína VP7 sobre las MEP (Au et al., 1993; M. K. Estes & Greenberg, 2013; L. Hu, Crawford, Hyser, et al., 2012; O'Brien et al., 2000; J. Taylor et al., 1993; J. A. Taylor et al., 1996; Trask & Dormitzer, 2006). El ambiente rico en calcio del lumen del RE promueve la interacción de las moléculas de VP7, ubicadas en la membrana de la MEP, con la capa de VP6 de la DLP contenida dentro de la envuelta lipídica transitoria (T. López et al., 2005). A su vez, NSP4 actúa como vioporina (Hyser et al., 2010) promoviendo el aumento del nivel de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma celular procedente del interior del RE necesario para estabilizar la capa externa de la TLP. Por mecanismos no del todo conocidos, la

membrana que recubre la DLP en las MEP se pierde y las proteínas de la cápsida externa VP4 y VP7 se ensamblan a la DLP, formando partículas maduras, TLP.

El ciclo infeccioso termina cuando los viriones se liberan de las células infectadas. Los estudios realizados en cultivos celulares indican que los viriones de RV son capaces de salir de las células infectadas a través de diferentes mecanismos: tanto por lisis celular en células no polarizadas (Musalem & Espejo, 1985) como por un transporte vesicular no clásico, independiente de Golgi, en células epiteliales polarizadas (M. K. Estes & Greenberg, 2013; Jourdan et al., 1997). No se conoce con certeza si durante este proceso RV se apropia de la maquinaria celular haciendo uso de los filamentos de actina para salir de la célula (Cudmore et al., 1995), o si el virus simplemente accede a una vía secretora preexistente. Se conoce que VP4 interactúa con filamentos de actina y lípidos, de modo que VP4 puede participar en el proceso de desestabilización de la membrana celular y salida de las células al interactuar con dichos filamentos (Gardet et al., 2006, 2007).

## 1.5 Clasificación y epidemiología

Actualmente, RV se clasifica en función de la secuencia de VP6 (Matthijnssens et al., 2012) en 10 especies/grupos (denominados alfabéticamente, A-D F-J). En 2019, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) eliminó el rotavirus E como especie debido a la falta de aislamientos de estos virus desde los realizados cuando se estableció dicha especie en 1999 (Pedley et al., 1986).

Cuatro de los grupos (A, B, C y H) infectan a humanos y animales, mientras que el resto de los grupos únicamente se han encontrado en animales. Dentro de cada grupo, a su vez, se diferencian diferentes serotipos G y P basados en la variabilidad de secuencia encontrada en los epítomos neutralizantes de las proteínas de la cápsida externa. VP4 determina el tipo P (proteína sensible a Proteasas) y VP7 determina el tipo G (Glicoproteína). Se conocen 32 genotipos G y 47 genotipos P del grupo A, pero sólo unas pocas combinaciones de estos producen la mayoría de los casos en humanos (Matthijnssens et al., 2008). Recientemente, se describió un nuevo método de clasificación en función del grado de similitud entre las secuencias de cada uno de los 11 segmentos de RNA de RV (Matthijnssens et al., 2008). Esta clasificación ha permitido evaluar el posible origen animal de las cepas de RV humanos más comunes, y su uso se está ampliando al estudio de la epidemiología a nivel molecular, al impacto de los programas de vacunación, así como al análisis de la evolución de los diferentes grupos de RV ya conocidos y de la aparición de nuevos RV por transmisión entre especies.

En relación a las infecciones causadas en humanos, RVA es la especie más relevante y más estudiada debido a su mayor morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años (John T Patton, 2012; Troeger et al., 2017), por lo que ha monopolizado la investigación sobre este patógeno y es el objetivo de los programas de vacunación (Patton J, T., 2012). RVB y RVH se han asociado con epidemias de diarrea severa fundamentalmente en adultos en Asia, mientras que los RVC se encuentran asociados con brotes

epidémicos familiares e infecciones en niños un poco mayores que los afectados por el grupo A (Caul et al., 1990; Fang et al., 1989; Kimura et al., 1989).

La prevalencia de las especies distintas a RVA se desconoce y, además, la dimensión de su morbilidad y mortalidad podría estar infraestimada debido a que no son detectados por los reactivos empleados rutinariamente para el diagnóstico (Glass et al., 2001). A este respecto, es importante recordar que se desconoce la etiología de un 28% de las muertes causadas por diarrea (Troeger et al., 2017) y que datos recientes indican que incluso en países con una elevada tasa de vacunación (mayor a un 93%) con vacunas de alta eficiencia, RV persiste en la población, donde parece afectar fundamentalmente a niños mayores, no vacunados, y a la población anciana (Sue E Crawford et al., 2017; John T Patton, 2012). Existe muy poca información sobre la biología molecular de los RV que no pertenecen al grupo A. Su caracterización sería de enorme utilidad para entender las causas subyacentes a su habilidad para infectar niños mayores y adultos y es un paso necesario para diagnosticar nuevos brotes, prevenirlos y combatirlos.

RV es una de las principales causas de diarrea animal en todo el mundo, dando lugar a infecciones asintomáticas y sintomáticas (Martella et al., 2010) en animales de granja (vacas, cerdos, ovejas), animales exóticos (llamas, jirafas), primates (macacos), mascotas domésticas (perros, gatos), roedores y aves (Maclachlan & Dubovi, 2011; Marthaler et al., 2013; Ng et al., 2014; Papp et al., 2013). Esto es de especial importancia en determinados sectores como el ganadero, donde terneros y lechones afectados por RV causan grandes pérdidas económicas por los gastos asociados a su tratamiento y las altas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a estas infecciones (Martella et al., 2010). Además, los RV animales pueden infectar a humanos por transmisión directa del virus o mediante la generación de nuevas cepas surgidas de reordenamientos genéticos con cepas humanas (Komoto et al., 2011; Mukherjee et al., 2011). Ambos procesos ocurren más comúnmente en países en vías de desarrollo (Bwogi et al., 2017), donde los niños a menudo se infectan con múltiples cepas de RV al mismo tiempo y están en estrecho contacto con animales. Por ello, la vigilancia conjunta de las cepas de RV animales y humanos así como su caracterización genética es vital para comprender las relaciones entre los virus que circulan conjuntamente (Vlasova et al., 2017), diagnosticar nuevos brotes, prevenirlos y combatirlos, así como evaluar los programas de vacunación (Kirkwood, 2010), especialmente en regiones con altas tasas de incidencia y mortalidad.

## **1.6 Producción de pseudopartículas similares a virus de rotavirus**

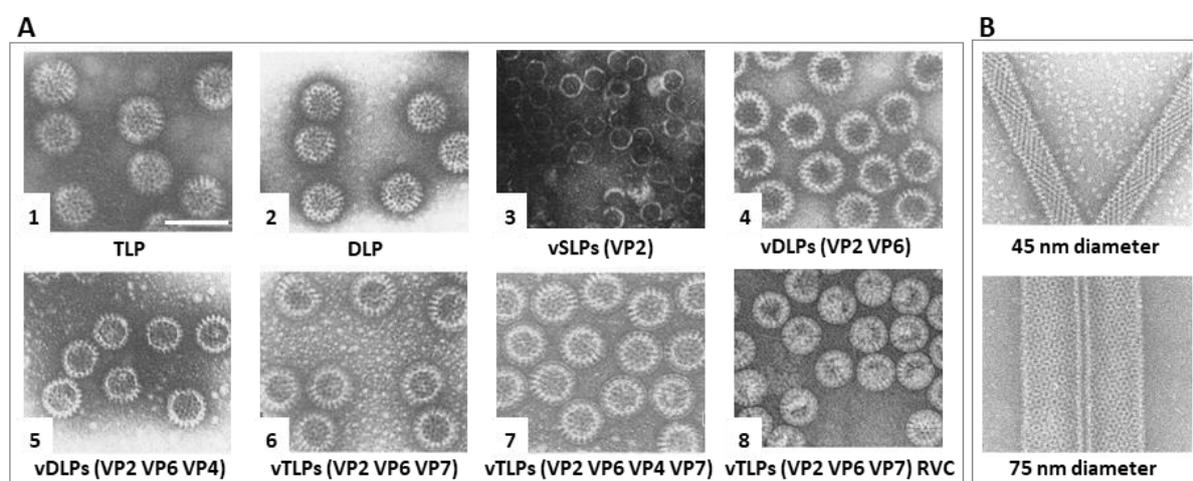
Debido a la importancia para la salud humana y animal de los rotavirus pertenecientes al grupo A, y a la dificultad para la adaptación al crecimiento *in vitro* de los RV, la mayoría de los estudios sobre la estructura de RV se han realizado sobre las pocas estirpes de RVA adaptadas con éxito al crecimiento en el laboratorio (Urasawa et al., 1981; Ward et al., 1984). Esta dificultad para cultivar RV ha llevado

a la aplicación de otras metodologías para el estudio y la caracterización estructural de los diferentes grupos que componen este género. Una de esas metodologías es la aplicación de sistemas de expresión heterólogos para la generación de pseudo-partículas (*virus-like particles*, VLP) similares a las producidas durante una infección natural por RV, fundamentalmente aplicada al estudio de RVA. Con este objetivo, se han empleado con éxito sistemas de expresión basados en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Rodríguez-Limas et al., 2011), células procariotas (*E. coli* BL21 (DE3)) (T. Li et al., 2014), plantas transgénicas (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Lycopersicon esculentum*) (Pêra et al., 2015; Saldaña et al., 2006; Yang et al., 2011), células transformadas de *Drosophila melanogaster* (Lee et al., 2011) o células de mamífero (células Vero 2-2) (Laimbacher et al., 2012). Sin embargo, en la mayoría de los estudios se ha utilizado el sistema de expresión con baculovirus recombinantes (rBV) en células de insecto (*Baculovirus expression vector system*, BEVS).

Desde 1983, cuando esta técnica se introdujo para la expresión de IL-2, el BEVS ha evolucionado hasta convertirse en uno de los sistemas eucarióticos más potentes y versátiles para la expresión de proteínas recombinantes (Felberbaum, 2015; Irons et al., 2018; Jarvis, 2009; Smith et al., 1983). El sistema más común está basado en el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV o AcNPV), empleando como huéspedes para su propagación líneas celulares derivadas de miembros de la familia *Noctuidae* como *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*. Este sistema presenta una serie de características que lo hacen conveniente para la expresión de VLPs de RV (Beljelarskaya, 2011). Es un sistema eficaz que permite la identificación y generación de rBV para la expresión heteróloga de proteínas de forma segura, ya que los baculovirus tienen un estricto rango de huésped y no infectan mamíferos ni plantas. El empleo de promotores muy tardíos de baculovirus hace que la expresión de las proteínas recombinantes se inicie después de la generación de virus infectivos, lo que garantiza el aislamiento de virus que expresan proteínas incluso letales para la célula. Estos promotores son, además, capaces de promover elevados niveles de expresión de las proteínas heterólogas. Por otro lado, los modernos sistemas BEVS han sido diseñados para simplificar la construcción de baculovirus que expresan simultáneamente varias proteínas, lo cual, unido a la posibilidad de coinfectar con varios baculovirus, simplifica la expresión de complejos multiproteicos (Y. C. Hu, 2005; Kost et al., 2005). Finalmente, las células de insecto empleadas para la para la expresión de las proteínas heterólogas permiten la realización de modificaciones postraduccionales como glicosilación, fosforilación, acetilación y acilación similares a las realizadas en células de mamífero (Summers, 2006).

La expresión de combinaciones de proteínas estructurales de RV mediante BEVS ha permitido el aislamiento de diferentes partículas y subpartículas virales de estirpes de RVA y RVC, incluyendo pseudo-SLPs (*virus-like particle* SLP, vSLP), pseudo-DLP (vDLP) y pseudo-TLP (vTLP). En el caso de RVA, la expresión de la proteína VP2 de forma individual permite purificar partículas similares a SLP (Fig. 8A, panel 3) (Labbé et al., 1991), formadas únicamente por VP2, junto con la maquinaria de transcripción, mediante la coexpresión de VP2 con VP3 y/o VP1. La coexpresión de las proteínas VP2

y VP6 permite el ensamblaje de vDLP (Fig. 8A, panel 4), siendo VP2 la proteína de andamiaje sobre la que VP6 se ensambla (Jayaram et al., 2004). Según la combinación de proteínas estructurales expresadas de forma conjunta, se han llegado a generar partículas vDLP formadas por VP2/6, VP1/2/6, VP2/3/6, VP1/2/3/6, VP2/4/6 (Fig. 8A, panel 5), así como partículas vTLP formadas por VP2/6/7 (Fig. 8A, panel 6) y VP2/4/6/7 (Fig. 8A, panel 7) (S E Crawford et al., 1994; Zeng et al., 1996a, 1996b) (Fig. 8A). Es importante destacar que, teniendo en cuenta al nivel de resolución alcanzado en estos estudios indicados, se ha observado que las VLP generadas por el autoensamblaje de las diferentes proteínas expresadas mantienen las características estructurales, y también antigénicas, de las partículas naturales producidas durante la infección. La expresión aislada de VP6 mediante el sistema BEVS da lugar a la formación de partículas esféricas (Fig.8A), matrices cristalinas 2D y tubos helicoidales (Fig. 8B) en función del pH (Mary K Estes et al., 1987; Lepault et al., 2001; Ready & Sabara, 1987). Estos ensamblados mantienen sus determinantes antigénicos. Los tubos de VP6 muestran una matriz hexagonal de subunidades que se asemejan a las observadas en muestras de heces de niños y animales infectados con RV (Mary K Estes et al., 1987).



**Figura 8. ME por tinción negativa de diferentes VLP de RV producidas por coexpresión de los rBV indicados. (A)** 1. Partículas TLP nativas de SA11; 2. Partículas DLP nativas de SA11; 3. Partículas vSLP (VP2) de SA11; 4. Partículas vDLP (VP2/6) de SA11; 5. Partículas vDLP (VP2/6/4) de SA11; 6. Partículas vTLP (VP2/6/7) de SA11; 7. Partículas vTLP (VP2/6/4/7) de SA11; 8. Partículas vTLP (VP2/6/7) de RVC. **(B)** Estructuras tubulares de VP6. Tubos de 45 nm de diámetro (arriba) y tubos de 75 nm de diámetro (abajo). La barra de escala representa 100 nm. Figura adaptada de (S E Crawford et al., 1994) y (Lepault et al., 2001).

Además de estudios con estirpes de RVA, el BEVS se ha empleado con éxito para la generación de VLPs de RVC formadas por VP2/6/7 (Fig. 8A, panel 8) o VP6/7 (Clark K. B. et al., 2009) así como para la expresión de vTLP híbridas compuestas por proteínas estructurales de RVA y RVC (A-VP2/C-VP6/C-VP7, A-VP2/C-VP6/A-VP7 y A-VP2/A-VP6/C-VP7) (Y. Kim et al., 2002); sin embargo, no se ha conseguido generar VLP para el resto de especies de RV ni estudiar la estructura a nivel atómico o cuasi atómico de las mismas.

El uso de VLP en RV también ha permitido el estudio a nivel estructural y la caracterización de epítomos neutralizantes y no neutralizantes en VP4 y VP7 mediante ensayos ELISA y de hemaglutinación (S E Crawford et al., 1994; Fiore et al., 1991). Asimismo, la versatilidad de este sistema de expresión ha permitido estudiar en mayor profundidad el sistema de síntesis de (-)ssRNA llevado a cabo por VP1 a partir de moldes de (+)ssRNA de RV empleando VLP generadas por la expresión de diferentes combinaciones de proteínas estructurales (D Chen et al., 1994; Zeng et al., 1996b). Estas VLP también son de interés en ámbitos sanitarios y científico-tecnológicos, bien como agentes de administración (*nanocarriers*) de fármacos (Zhao et al., 2011) o cómo vehículos para la generación de vacunas (Heinimäki et al., 2019; Kushnir et al., 2012).

## *Objetivos*

---

El presente trabajo pretende profundizar en el conocimiento sobre la estructura de la partícula viral de los miembros del grupo rotavirus.

La importancia socio sanitaria de los rotavirus de la especie A ha estimulado una intensa labor de investigación sobre estos virus. Como resultado, existe una abundante información sobre la estructura de la partícula viral de las estirpes modelo de esta especie, habiéndose determinado la estructura atómica de la TLP activada proteolíticamente (Settembre et al., 2011) y de la DLP (McClain et al., 2010), así como de las diferentes proteínas estructurales (Estrozi et al., 2013; Jenni et al., 2019; Kumar et al., 2020). Esto ha permitido proponer un mecanismo para el proceso de penetración de la TLP en la célula diana cuyo funcionamiento depende esencialmente de las proteínas de la capa externa de la TLP (Baker & Prasad, 2010; Rodríguez et al., 2014; Zárate et al., 2004). Dicho mecanismo de entrada se inicia a partir de una TLP inactiva que es competente para la interacción con la membrana celular (S. M. Clark et al., 1981), pero que no es capaz de generar una infección productiva (Arias et al., 1996; Gilbert & Greenberg, 1998; D. Y. Graham & Estes, 1980; Rodríguez et al., 2014). El paso de activación, que transforma a la TLP en infectiva, consiste en el procesamiento proteolítico de los trímeros de VP4 que constituyen la espícula (Arias et al., 1996; S. M. Clark et al., 1981; D. Y. Graham & Estes, 1980; Ludert et al., 1996). Este proceso está poco caracterizado, desconociéndose, por ejemplo, la estructura atómica de la espícula no digerida (Sue E. Crawford et al., 2001; Rodríguez et al., 2014), incluyendo los bucles en los que se encuentran los sitios de procesamiento para su activación (Herrmann et al., 2021; Settembre et al., 2011). Uno de los objetivos generales de este trabajo es aportar información sobre este paso clave en la infección viral mediante la determinación de la estructura atómica de la TLP antes y después de su procesamiento por tripsina.

El estudio sobre el resto de las especies (no-A) que forman el género rotavirus se ha centrado en la epidemiología de estos virus, por lo que nuestro conocimiento sobre su estructura es prácticamente nulo. En buena parte, esto se debe a los problemas encontrados para crecer estos virus en el laboratorio, que hacen muy difícil la obtención de cantidad suficiente de material como para abordar su caracterización estructural. Esto hace necesarias aproximaciones alternativas para el estudio estructural de las especies no cultivables. La expresión de las proteínas estructurales de rotavirus en sistemas heterólogos parece ser una aproximación viable, ya que, a pesar de la compleja morfogénesis de la TLP durante la infección natural, se ha demostrado para varias estirpes de las especies A y C que la expresión simultánea de sus componentes en diversos sistemas heterólogos permite el aislamiento de partículas similares a virus esencialmente idénticas a las DLP y TLP generadas durante la infección natural. Es posible, además, generar TLP *in vitro* empleando como material de partida sus componentes: DLP, VP7 y VP4 purificados, y emulando *in vitro* el proceso de recubrimiento de la DLP que ocurre en el retículo endoplásmico. Sorprendentemente, este proceso es más eficaz *in vitro* que en los sistemas heterólogos (J. Z. Chen et al., 2009; Herrmann et al., 2021; Trask & Dormitzer, 2006). Además, la estructura de la capa de VP7 y de las espículas producidas de esta forma ha sido determinada en la especie A, y refleja

fielmente la estructura de la capa externa de la TLP natural (Herrmann et al., 2021). Por lo tanto, la posibilidad de obtener DLP en un sistema heterólogo es clave para poder abordar la determinación de la estructura de las especies no cultivables de rotavirus, ya que nos permite emplear la coexpresión de diferentes proteínas estructurales para la obtención de estas DLP, o el recubrimiento *in vitro* de las mismas para obtener TLP. El segundo objetivo general de este trabajo pretende abordar el estudio sistemático de la estructura de los miembros del género rotavirus. Para ello se estudiará la generación de DLP de las estirpes de referencia de las diferentes especies empleando como sistema heterólogo de expresión el sistema de baculovirus. Además, se determinará la estructura atómica de la DLP y de la pseudo DLP de la especie A para determinar la fidelidad del ensamblaje de la pseudo DLP mediante este sistema.

Por otro lado, uno de los problemas asociados con la reconstrucción de la estructura de la TLP es el hecho de que no se encuentran espículas en todas las posiciones en las que de forma ideal se deberían encontrar dando lugar a una menor resolución, algo que ocurre en la purificación de TLP naturales (Dayue Chen & Ramig, 1992) y, más aún, en las generadas durante el proceso de expresión en sistemas heterólogos (S E Crawford et al., 1994) o durante el recubrimiento *in vitro* (J. Z. Chen et al., 2009; Trask & Dormitzer, 2006). Por ello, uno de los objetivos de este proyecto es la generación de una metodología robusta para el estudio de estructuras con baja resolución asociadas a una elevada flexibilidad, que pretendemos poner a punto con la espícula de las TLP naturales.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1.- Determinación y análisis de la estructura atómica de la TLP de RVA preparada en presencia y en ausencia de tripsina. Desarrollo de una metodología para la reconstrucción de la espícula.
- 2.- Determinación y análisis de la estructura atómica de la DLP natural de la especie A, y de la pseudo DLP correspondiente obtenida mediante el sistema de expresión basado en baculovirus
- 3.- Estudio de la formación de pseudo DLP de las estirpes modelo de las distintas especies de RV en el sistema de expresión basado en baculovirus.
- 4.- Determinación y análisis comparativo de la estructura atómica obtenida para las pseudo DLP de las distintas especies de rotavirus.

## *Materiales y métodos*

---

### 3.1 Material biológico

#### 3.1.1 Células procariotas

La cepa bacteriana *Escherichia coli* XL10-Gold (Stratagene) fue utilizada para la propagación de los plásmidos recombinantes. Esta cepa se creció a 37°C en el medio líquido Luria Broth (LB) (peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L) o en placa utilizando el mismo medio con agar al 1,5%. El medio LB se suplementó con 150 µg/ml ampicilina y 50 µg/ml carbenicilina para la selección de las bacterias portadoras de plásmidos.

Las cepas de *Escherichia coli* DH10-Bac (Luckow et al., 1993) y DH10-MultiBac (Berger et al., 2004) se utilizaron para la generación de bácmidos recombinantes mediante transposición. Las cepas se crecieron a 37°C en medio líquido LB o en placa utilizando el mismo medio con agar al 1,5%. El medio LB se suplementó con 50 µg/ml kanamicinina, 10 µg/ml tetraciclina y 7 µg/ml gentamicina para la amplificación de las bacterias portadoras de bácmidos recombinantes.

#### 3.1.2 Células eucariotas

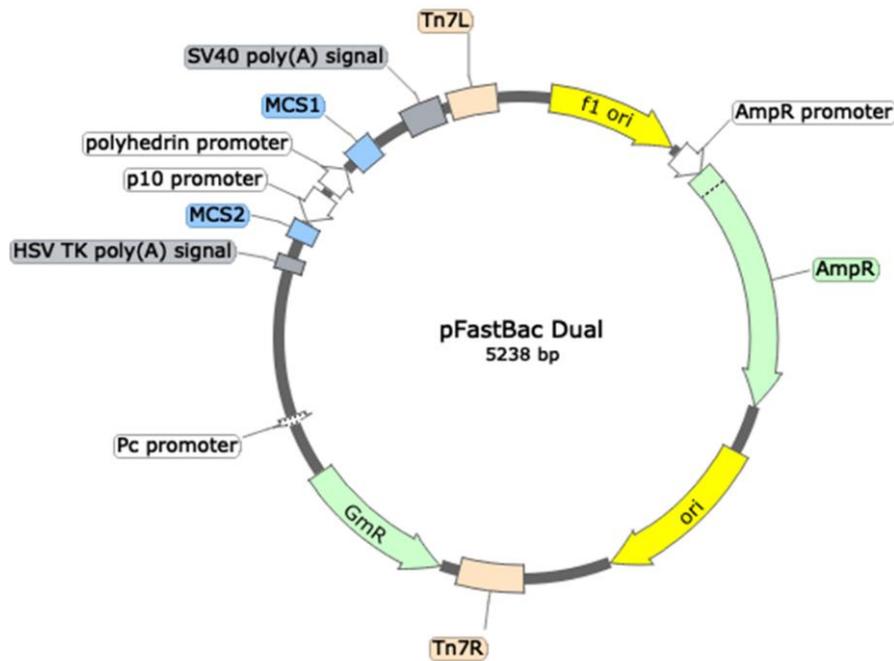
Para la generación y la amplificación de baculovirus recombinantes, así como para la expresión de proteínas mediante infecciones con baculovirus se utilizaron las líneas celulares *Sf-9* (ECACC 89070101, Sigma-Aldrich) y *Sf-21* (ECACC 05022801, Sigma-Aldrich) derivadas del tejido de ovario de la pupa de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977). Para la realización de infecciones destinadas a la producción de proteínas se empleó también la línea celular BTI-Tn-5B1-4 (*High Five*, H5, Invitrogen), derivada de células ováricas de *Trichoplusia ni* (Wickham et al., 1992). Las líneas celulares de insecto se crecieron en monocapa a 27°C en medio TC-100 (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml). Para los ensayos de formación de placas de lisis se emplearon células Sf9 adaptadas al crecimiento en medio Sf-900 III mantenidas en suspensión en reactores GLS 80 (Duran) a 75 rpm en medio suplementado con penicilina (25 U/ml) y estreptomycinina (25 µg/ml) a 27°C.

Para la amplificación de rotavirus se empleó la línea celular MA104 (ECACC 85102918, Sigma-Aldrich), una línea celular adherente derivada de epitelio de riñón de mono verde africano. Las células se crecieron en medio MEM suplementado con 2 mM glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal. Las células se mantuvieron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en crecimiento constante mediante pases 1:10 y se emplearon entre los pases 7 y 24.

#### 3.1.3 Virus

Se empleó el clon C4111 de la cepa de rotavirus A de simio SA11 (RVA/Simian-tc/ESP/SA11-C411/2009/G3P[2]) (Rodríguez et al., 2014). Se utilizaron virus amplificados 3 veces desde el último paso de purificación de placa de lisis. Los virus fueron cedidos por el laboratorio donde se realizó este trabajo.

Los baculovirus empleados se generaron a partir de los bácmidos obtenidos mediante los sistemas de expresión en baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen, (Luckow et al., 1993)) y MultiBac (Geneva Biotech, (Berger et al., 2004)). Los baculovirus empleados para la expresión de las proteínas VP2 y VP6 del rotavirus SA11 fueron obtenidos del laboratorio donde se desarrolló esta tesis. Estos baculovirus se construyeron empleando el plásmido pFastBacDual como vector en el sistema Bac-to-Bac, y contienen las fases de lectura abierta de VP2 (GenBank KJ450832) y VP6 (GenBank KJ450836) bajo el control de los promotores p10 y polh respectivamente.



**Figura 9. Dibujo esquemático del plásmido pFastBacDual empleado para la generación de los rBV.** Se indican los promotores, origen de replicación del plásmido (ori), secuencias de resistencia frente a los antibióticos ampicilina (AmpR) y gentamicina (GmR) y las regiones donde se clonan las proteínas a expresar (MCS, *multicloning sites*).

### 3.1.4 Plásmidos

Para la construcción de los rBV de los diferentes rotavirus no-A se empleó también el plásmido pFastBacDual (Invitrogen) (Figura 9). La secuencia codificante correspondiente a la proteína VP2 se situó bajo el control del promotor p10 (insertada en el plásmido sustituyendo a los nucleótidos 4304-4310) y la correspondiente a la proteína VP6 bajo el control del promotor polh (insertada en el plásmido sustituyendo a los nucleótidos 4304-4310). Los plásmidos fueron sintetizados por la empresa Synbio Technologies (<https://www.synbio-tech.com>).

Se indica la información sobre las secuencias codificantes empleadas en la tabla 1. Los ácidos desoxirribonucleicos (DNA) sintetizados se emplearon directamente para la producción de bácmidos recombinantes. En el presente trabajo se utilizaron secuencias de referencia para los grupos de rotavirus (B-D, F-I) pero no el grupo J (Bányai et al., 2017) el cual surgió durante la elaboración de esta tesis.

Especie RV	Estirpe	Huésped	Genoma ID	GenBank VP2	GenBank VP6
B	Bang373	Humano	18303	NC_021545	NC_021544
C	Bristol	Humano	5661	NC_007546	NC_007570
D	05V0049	Pollo	4049	NC_014512	NC_014516
F	03V0568	Pollo	18363	NC_021626	NC_021635
G	03V0567	Pollo	18316	NC_021580	NC_021588
H	J19	Humano	5665	NC_007549	NC_007553
I	KE135	Perro	36964	NC_026826	NC_026829

**Tabla 1. Secuencias empleadas para la construcción de los rBV.** Se indican en la tabla el número identificativo del genoma empleado en la base de datos Genome del NCBI (Genoma ID), y los números de acceso de los segmentos en los que se encuentran codificadas las proteínas VP2 (GenBank VP2) y VP6 (GenBank VP6) en la base de datos GenBank.

### 3.1.5 Preparación de bécmidos recombinantes

Los bécmidos recombinantes se generaron empleando los sistemas de expresión en células de insecto Bac-to-Bac (Invitrogen) y MultiBac (Geneva Biotech) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, 100 ng del plásmido intermedio pFastBacDual correspondiente se utilizaron para transfectar 100  $\mu$ l de bacterias competentes de la cepa de *E. coli* DH10-Bac (Bac-to-Bac) o DH10-MultiBac (MultiBac). Finalizada la transfección, las bacterias se crecieron durante 5 horas a 37°C con agitación para permitir la transposición de las secuencias de interés desde el plásmido al genoma del bécrido. Los bécridos recombinantes se seleccionaron en medio sólido LB-agar que contenía 50  $\mu$ g/ml kanamicinina, 10  $\mu$ g/ml tetraciclina, 7  $\mu$ g/ml gentamicina, 200  $\mu$ g/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y 40  $\mu$ g/ml de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). Las colonias que contenían bécridos en los que había ocurrido la transposición, es decir, colonias blancas de gran tamaño sobre un fondo de colonias azules, se seleccionaron y se volvieron a crecer en medio sólido en las mismas condiciones para verificar su fenotipo. Posteriormente se preparó el DNA del bécrido presente en tres colonias para cada uno de los recombinantes siguiendo el protocolo recomendado por Invitrogen (*Bac-to-Bac Baculovirus Expression System Manual*, versión D, abril 2004).

## 3.2 Infecciones, transfecciones y expresión de proteínas

### 3.2.1 Transformación de células de insecto

Para la generación de los rBV a partir de los bécridos se sembraron células Sf9 crecidas en medio TC100 con 10% suero fetal y sin antibióticos en placas de 12 pocillos a una concentración de  $\sim$ 100,000 células/cm<sup>2</sup>. Una vez adheridas, las células se transfectaron, siguiendo las recomendaciones del fabricante, con 5  $\mu$ l de la preparación de bécrido empleando 1  $\mu$ l del reactivo *TransIT-Insect Transfection Reagent* (Mirus Bio). Las células junto con el medio de cultivo se recogieron cuando más del 90% mostraban efecto citopático, y se centrifugaron a 2500g durante 10 minutos a 4°C. El

sobrenadante, que contiene los baculovirus, se recogió y se almacenó a 4°C protegido de la luz. Esta preparación de baculovirus se denominó pase cero (P0), y se empleó para realizar dos rondas sucesivas de amplificación (P1 y P2) con el objetivo de aumentar y estabilizar la infectividad específica. Las infecciones para la producción de proteínas se realizaron en todos los casos con baculovirus correspondientes a un P2.

### **3.2.2 Infecciones de células de insecto con baculovirus**

Para las infecciones destinadas a la amplificación de los baculovirus se sembraron monocapas de células Sf9 en medio TC100 suplementado a una densidad de  $\sim 170,000$  células/cm<sup>2</sup>. Una vez adheridas se retiró el medio de cultivo y se añadió la cantidad de virus correspondiente a una multiplicidad de infección de 0.1 unidades formadoras de placa (ufp)/célula en un volumen de inóculo aproximadamente igual a 1/10 del volumen del medio de cultivo recomendado para cada tipo de placa. La adsorción se realizó durante 1 h a 27°C con agitación periódica y posteriormente el inóculo se retiró y se añadió medio de cultivo. Los cultivos se recogieron cuando y como se ha indicado para la preparación del P0, se filtraron a través de un filtro de 0.2  $\mu$ m y se almacenaron a 4°C en oscuridad. Para la preparación del P1 se asumió que el P0 correspondiente tenía una concentración de  $1 \times 10^7$  ufp/ml. Para la preparación del P2 de cada virus, previamente se determinó la concentración de virus infectivos del P1 correspondiente.

Las infecciones destinadas a la producción de proteína se realizaron de forma similar empleando la densidad celular indicada anteriormente para las células Sf9 y Sf21, y una densidad de  $\sim 114,000$  células/cm<sup>2</sup> para las células H5. Las células se infectaron con una multiplicidad de infección de 0.3, salvo que se indique lo contrario. El sobrenadante de infección se suplementó con inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) cada 24 horas a partir de las 48 hpi hasta su tiempo de recolección determinado en cada caso.

### **3.2.3 Determinación de la concentración de rBV infectivos**

La concentración de virus infectivos de las diferentes preparaciones se determinó mediante ensayos de formación de placas de lisis. Para ello, se sembraron células Sf9 crecidas en suspensión en medio Sf-900 III (Invitrogen) en placas de 6 pocillos a una concentración de 170,000 células/cm<sup>2</sup> y, una vez adheridas, se infectaron con diluciones seriadas de la preparación en medio Sf-900 III. Tras 1 h de absorción, se retiró el inóculo y se añadieron en cada pocillo 2 ml de una mezcla de 100 ml de medio Sf-900 1.3x (Invitrogen) suplementado con 50  $\mu$ g/ml de DEAE/Dextrano (SIGMA), 25 U/ml de penicilina, 25  $\mu$ g/ml de estreptomicina y 6.25  $\mu$ g/ml de anfotericina (SIGMA), y mantenido a 37°C, con 30 ml de 2.2% agarosa SeaKem ME (Lonza) mantenida a 48°C. Una vez gelificada la mezcla, las placas se incubaron en una cámara húmeda a 27°C en la oscuridad durante 5-7 días hasta que se detectó la aparición de placas de lisis. Las placas fueron teñidas añadiendo a cada pocillo 0.5 ml de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; ThermoFisher Scientific) a 2 mg/ml en PBS e incubando durante 12 h a temperatura ambiente en oscuridad.

### 3.3 Purificación de proteínas y ensamblados virales

#### 3.3.1 Purificación de partículas virales de rotavirus

Para la purificación de rotavirus se infectaron monocapas de células MA104 tres días después de haber alcanzado la confluencia. Las monocapas se lavaron dos veces con medio sin suero y se infectaron con una multiplicidad de infección de 0.1 en el caso de las preparaciones de virus realizadas en presencia de tripsina, y con una multiplicidad de infección de 10 para las realizadas en ausencia de tripsina. Previamente los virus fueron activados durante 30 minutos a 37°C con 100 BAEE U/ml de tripsina tratada con TPCK (ThermoFisher Scientific). La adsorción se llevó a cabo en medio sin suero, en un volumen de inóculo aproximadamente igual a 1/10 del volumen del medio de cultivo recomendado para cada tipo de placa, durante 90 minutos con agitación periódica. Una vez finalizada la adsorción el inóculo se retiró y, en el caso de las preparaciones realizadas en presencia de tripsina, se añadió medio de cultivo sin suero suplementado con gentamicina (50 µg/ml) y tripsina (10 BAEE U/ml). En el caso de las preparaciones realizadas en ausencia de tripsina, las monocapas se lavaron dos veces con medio sin suero y, finalmente, se añadió medio sin suero suplementado con gentamicina (50 µg/ml) y leupeptina (0.5 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron hasta la aparición de efecto citopático total en el caso de los virus preparados en presencia de tripsina, o durante 24 h en el caso de las preparaciones realizadas en su ausencia.

Los cultivos se recogieron y las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C a partir de este punto. En el caso de las preparaciones realizadas en ausencia de tripsina, se mantuvo una concentración de 0.5 µg/ml de leupeptina a lo largo de todo el proceso. Las muestras, células infectadas y sobrenadante de cultivo, se separaron por centrifugación a 12,500g durante 20 minutos. El sobrenadante y el sedimento de la centrifugación se procesaron de forma independiente. El sobrenadante se ajustó a un 10% peso/volumen (p/v) de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) y un 2.3% p/v de NaCl y se incubó durante 18 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 10,000g y el sedimento, que contiene los virus, se resuspendió en un 1/100 del volumen inicial de tampón TBS (25 mM Tris base, 0.7 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucosa, 136.9 mM NaCl, 5.1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) (McClain et al., 2010). El sedimento de células infectadas se resuspendió en 1/50 del volumen inicial de medio de cultivo, se congeló y descongeló 3 veces, y se clarificó mediante centrifugación a 12,500g durante 20 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se añadió al virus obtenido del sobrenadante del cultivo, y la mezcla se sedimentó a través de un colchón de sacarosa (40% p/v) en TBS mediante ultracentrifugación durante 150 minutos a 70,000g. El pellet, que contiene virus semi purificado, se resuspendió en 1/100 del volumen inicial de cultivo de TBS y se extrajo dos veces con 1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluoropentano (Vertrel XF, Sigma-Aldrich). La muestra extraída se ajustó con CsCl a una densidad de 1.37 g/ml ( $\eta = 1.3690$ ) y se centrifugó en un rotor casi vertical durante 180 minutos a 300,000g. Normalmente, al final de esta centrifugación se distinguen dos bandas,

una más alta que corresponde a las TLP y otra más baja que contiene las DLP. Las bandas se recogieron y se sometieron, por separado, a una segunda centrifugación en las mismas condiciones para obtener TLP y DLP altamente purificadas. Las muestras finales se dializaron frente a TBS y se concentraron mediante centrifugación a 100,000g durante 90 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en un volumen de TBS  $\leq 1/5000$  del volumen inicial de medio de cultivo y se conservaron a 4°C.

### **3.3.2 Preparación de DLP**

Muestras de TLP purificadas se ajustaron a 20 mM EDTA y se incubaron durante 60 minutos a 30°C. Posteriormente, las DLP formadas se purificaron mediante centrifugación en un gradiente de CsCl en presencia de 10 mM EDTA siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.3.1.

### **3.3.3 Purificación de ensamblados del sobrenadante de infecciones con rBV**

En análisis preliminares se evaluaron y ajustaron diferentes parámetros con el fin de conseguir una expresión máxima para cada una de las proteínas de interés. Para ello, cultivos preconfluentes de células de insecto H5, Sf9 y Sf21 fueron infectados con el rBV correspondiente, mantenidos a 18, 22 ó 27°C y recogidos a diferentes tiempos post-infección (hpi): 48, 72, 96, 120, 168 y 240 hpi. Con el fin de eliminar restos celulares el sobrenadante de infección fue centrifugado a 12,500xg durante 30 minutos. El sobrenadante clarificado fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en TNE (10 mM Tris pH 7.5, 0.7 M NaCl, 1 mM EDTA) y ultracentrifugado a 100,000xg durante 1h. El sedimento resultante fue resuspendido en 50  $\mu$ l tampón TNE y analizado por SDS-PAGE y microscopía electrónica por tinción negativa.

De forma general, en infecciones a gran escala en las que se utilizó un volumen de medio de cultivo mayor de 25 ml, el sobrenadante de infección clarificado se ajustó a 10% (p/v) de PEG 8000 y 2.3 % (p/v) de NaCl, suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) y se incubó con agitación suave toda la noche a 4°C. Al día siguiente fue centrifugado a 12,500xg durante 30 minutos. El precipitado resultante fue resuspendido en TNE y disgregado con un sonicador de punta (Branson Ultrasonics 101-063-275) a intervalos de 10 segundos durante 30 segundos aplicando una amplitud de 10% (200W). Una vez disuelto el precipitado, este fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en TNE y ultracentrifugado a 100,000xg durante 1h a 4°C. El sedimento resultante del colchón de sacarosa fue resuspendido en 500  $\mu$ l de tampón TNE. A continuación, y en función de la naturaleza de las proteínas expresadas, se realizaron diferentes pasos de purificación.

En infecciones con rBV para la expresión de proteínas VP2 y VP6 de RVA, el precipitado del colchón de sacarosa fue resuspendido en 500  $\mu$ l de TNE y extraído con el mismo volumen de Vertrel XF. Se centrifugó a 12,500xg durante 5 minutos en un rotor de ángulo fijo y la fase soluble resultante se cargó en un gradiente de CsCl. Para ello, la fase soluble se llevó a un volumen final de 5 ml, se añadieron 2 gr de CsCl y se mezcló con una solución de CsCl en tampón TNE a una densidad de 1.3620 g/ml. La muestra fue ultracentrifugada a 75,000xg en un rotor NVT65 (Beckman-Coulter Inc.) durante 17.5h.

Tras la ultracentrifugación se detectó una banda visible por refracción que fue recuperada por punción lateral con agujas hipodérmicas 23G y dializada 16 h frente a tampón TNE. A continuación, la muestra se concentró mediante ultracentrifugación a 100,000xg durante 1h. El precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón TNE. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4°C.

En infecciones con rBV para la expresión de proteínas VP2 y VP6 de RVD, el sedimento obtenido de la precipitación con PEG 8000 se resuspendió en tampón TNE y se procedió a realizar 4 centrifugaciones/resuspensiones sucesivas con el objetivo de solubilizar el mayor número de ensamblados presentes en la muestra. Los sobrenadantes obtenidos en cada una de estas centrifugaciones se juntaron y sonicaron a intervalos de 10 segundos durante 30 segundos con una sonda de punta (amplitud de 10%, 200W) (Branson Ultrasonics™ 101-063-275). El sobrenadante fue ultracentrifugado en un colchón de sacarosa al 25% durante 1 hora a 100,000xg. El sedimento precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ l de TNE y fue sometido a una ultracentrifugación en un gradiente lineal de sacarosa del 25 al 55% en TNE durante 1h a 100,000xg. El gradiente se recogió en 12 fracciones que se concentraron 20 veces mediante ultracentrifugación (1h a 100,000xg). Tras determinar bioquímicamente las fracciones enriquecidas en VP2 (~102 kDa) y VP6 (~45 kDa), esas fracciones fueron sometidas a un segundo gradiente lineal de sacarosa 25-55%, centrifugado en las mismas condiciones. A continuación, se recogieron 12 fracciones de 1 ml que se concentraron mediante ultracentrifugación (100,000xg, 1h). Los precipitados se resuspendieron en 50  $\mu$ l de tampón TNE. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4°C.

En infecciones con rBV para la expresión de proteínas VP2 y VP6 de RVI, el sedimento del PEG 8000 se purificó mediante un colchón de sacarosa al 35% centrifugando 1 hora a 100,000xg, y el sedimento se resuspendió en 500  $\mu$ l de TNE. Este fue extraído con un mismo volumen de Vertrel XF y centrifugado durante 5 minutos a 20,000xg en una microfuga. La fracción acuosa se concentró mediante ultracentrifugación (100,000xg, 1h). El precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón TNE. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4°C.

### **3.3.4 Purificación de ensamblados del interior celular derivados de la expresión con rBV**

Cultivos preconfluentes de células de insecto H5, Sf9 y Sf21 (de ~9 millones para las células Sf9 y Sf21 y de ~6 millones para las células H5) infectadas con los rBV correspondientes se mantuvieron a 27°C y se recogieron a las 144 hpi. Las células junto con el sobrenadante de infección fueron centrifugadas a 12,500xg durante 30 minutos. A continuación, el sobrenadante se separó y fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 35% en TNE y ultracentrifugado a 100,000xg durante 1h. El sedimento resultante fue resuspendido en 100  $\mu$ l de tampón TNE y guardado a 4°C.

A continuación, las células fueron lavadas con PBS, resuspendidas en 300  $\mu$ l de PBS y sonicadas a intervalos de 10 segundos durante 30 segundos. El extracto celular se dividió en tres fracciones y cada una de ellas fue sometida a diferentes tratamientos. Por un lado, una fracción fue mezclada con un

mismo volumen de Vertrel XF y se centrifugó 20,000xg durante 5 minutos a 4°C. Otro tercio del extracto celular fue mezclado con 10 µl de 10% Tritón X-100 en TNE 1X, incubado durante 30 minutos a 4°C con agitando intermitente cada 10 minutos y centrifugado a 20,000xg durante 5 minutos a 4°C. La última fracción de extracto celular se incubó con 10 µl de 10% IGEPAL en TNE 1X 10 minutos a temperatura ambiente y fue centrifugado a 20,000xg durante 5 minutos a 4°C. En todos los casos, las fases solubles fueron recuperadas y guardadas a 4°C para su posterior análisis. Los precipitados correspondientes a las fases insolubles se resuspendieron en 100 µl de tampón TNE y se guardaron a 4°C para su posterior análisis.

### **3.4 Análisis bioquímico**

#### **3.4.1 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemmli (Laemmli, 1970) de electroforesis en geles poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). En el caso de muestras de células, estas se resuspendieron en el medio de cultivo, se concentraron mediante centrifugación durante un minuto a 20,000xg y se lavaron dos veces con PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente, las muestras se resuspendieron en PBS a 4°C, se ajustaron a una concentración 1X de tampón de desnaturalización (4X: 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol, 40% glicerol y 400 mM DTT) y se incubaron durante 5 minutos a 100°C. En el caso de muestras purificadas estas fueron directamente ajustadas a una concentración 1X de tampón de desnaturalización e incubadas durante 5 minutos a 100°C.

Las muestras desnaturalizadas se cargaron en geles de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) al 12%. Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados con una solución de 10% ácido acético-50% etanol y teñidos con azul de Coomassie preparado al 0,005% (p/v) en una solución de 7.5% ácido acético, 5% etanol. El patrón de pesos moleculares de proteínas utilizado fue EZ-Run Protein Ladder (Fisher Scientific).

### **3.5 Microscopía electrónica**

#### **3.5.1 Adsorción de muestras y tinción negativa**

Sobre una gota (5 µl) de la muestra bajo estudio se depositó una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (Q150T, Quorum). Las rejillas se incubaron 3-5 minutos, posteriormente se lavaron 2 veces en el tampón donde se encuentran resuspendidas las muestras y el exceso de líquido fue eliminado mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (Whatman). Las rejillas fueron posteriormente incubadas sobre una gota de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 minuto y el exceso de agente de tinción se eliminó por contacto de la rejilla con papel de filtro grado 1 (Whatman). La concentración óptima para microscopía electrónica de transmisión de los diferentes ensamblados analizados fue determinada empíricamente

mediante la dilución seriada de los mismos en su tampón correspondiente. Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio electrónico Tecnai 12 (FEI) equipado con filamento de LaB<sub>6</sub> y estabilizado a 120 kV. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal de 26,000X (1.60 Å/píxel) en una cámara CCD (Charged Coupled Device) FEI Ceta.

### 3.5.2 Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión

Al tiempo postinfección deseado, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron químicamente en tampón compuesto por fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0.1M pH 7.4, 2.5% glutaraldehído y 2% paraformaldehído durante una hora a 4°C. Se realizaron 2 lavados con tampón de fosfato disódico (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4) y 2 lavados con agua destilada. A continuación, las muestras se incubaron con tetróxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>) 1% y ferricianuro potásico (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) 1% durante 1h a temperatura ambiente. Se realizaron 6 lavados con agua destilada y se incubaron las muestras con 0.15% ácido tánico en tampón fosfato disódico (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4) durante 1 minuto. Se realizaron 2 lavados con agua destilada y a continuación se tiñeron las muestras con acetato de uranilo 1% durante 1h a temperatura ambiente. Tras la postfijación, las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas durante 10 minutos a 4°C con concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 95 y 100%). Las muestras fueron infiltradas con resina epoxi y etanol 100% en una proporción 1:1 una hora a temperatura ambiente. A continuación, se infiltraron sólo con resina epoxi durante 12 horas tras las cuales se realizó un cambio de resina y se incubó a temperatura ambiente 2 horas. A continuación, las muestras fueron polimerizadas sobre la parte superior de cápsulas de gelatina del número 3 (*Snap-fit Gelatin capsules*) a 60°C durante 72h. Las células incluidas se tallaron con cuchillas de vidrio y se cortaron secciones ultrafinas (50-70 nm) con una cuchilla de filo de diamante con 5° de inclinación en un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica). Los cortes se depositaron en rejillas de cobre (100 mesh) recubiertas de Formvar. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo saturado en condiciones de humedad y, posteriormente, con citrato de plomo 2%. Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 FEI estabilizado a 120 kV o en un microscopio Thermofisher Scientific Talos F200G estabilizado a 200 kV. En ambos casos, las imágenes se registraron en una cámara CCD FEI Ceta a una magnificación nominal de 11,000x (3.83 Å/píxel) o 13,500x (2.26 Å/píxel), respectivamente.

### 3.5.3 Criomicroscopía electrónica

Para el análisis por criome, 5 µl de la muestra fueron incubados sobre una cara de rejillas de cobre-rodio u oro cubiertas con una película de carbón con agujeros (Quantifoil R2/2) previamente ionizadas mediante descarga iónica (Q150T, Quorum). Las muestras fueron vitrificadas en etano líquido a alta velocidad en un equipo de criofijación automática Leica EM GP2 quedando incluidas en una capa de hielo vítreo y conservando su estado nativo. Las muestras fueron analizadas bajo condiciones de mínima dosis electrónica en diferentes criomicroscopios Thermofisher Scientific Titan Krios operados a 300 kV empleando diferentes detectores directos en modo lineal.

En todos los casos, la recogida de datos se realizó con el programa de adquisición automática EPU (ThermoFisher Scientific) para el análisis de partículas. Las condiciones de adquisición para cada una de las muestras se indican en la tabla 2.

### 3.5.3.1 Procesamiento digital de las imágenes de partículas de rotavirus

Las operaciones generales de procesamiento de imagen fueron realizadas con los algoritmos de Xmipp (de la Rosa-Trevín et al., 2016) y RELION (Scheres, 2012) (Zivanov et al., 2018) integrados en la plataforma de Scipion (de la Rosa-Trevín et al., 2016). Las representaciones gráficas fueron generadas con el programa Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, (Pettersen et al., 2004)].

La figura 10 representa un resumen gráfico del esquema de procesamiento general seguido para todas las muestras bajo estudio. Los fotogramas de las películas adquiridas fueron alineados, corregidos por dosis y promediados con el programa MotionCor2 (Zheng SQ, Palovcak E, Armache JP, Verba KA, Cheng Y, 2017). Las micrografías promedio corregidas fueron posteriormente empleadas para estimar la función de transferencia de contraste (CTF) con CTFFIND4 (Rohou & Grigorieff, 2015). El rango de desenfoque estimado para las distintas muestras se indica en la tabla 2. Las partículas fueron seleccionadas automáticamente con la correspondiente rutina de Xmipp. Posteriormente, estas partículas seleccionadas fueron extraídas y normalizadas. Las partículas fueron clasificadas bidimensionalmente mediante la correspondiente rutina de RELION y las partículas seleccionadas fueron analizadas mediante la rutina de clasificación 3D del mismo programa. Dado el tamaño de las partículas, y con el objetivo de obtener una mayor eficiencia computacional, durante los pasos de clasificación 2D y 3D, las partículas fueron submuestreadas 3 veces respecto a la frecuencia de muestreo original. Las partículas seleccionadas fueron refinadas a la frecuencia de muestreo original con la rutina autorefine de RELION. La resolución de los mapas se calculó por la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel, 1984) entre dos mapas independientes, generados según la metodología *gold-standard*, que contienen cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en cada reconstrucción final.

La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0.143 (criterio FSC=0.143) (Rosenthal & Henderson, 2003). Las resoluciones calculadas para cada reconstrucción vienen indicadas en la tabla 2. A continuación, se realizó una corrección de las amplitudes en las altas frecuencias mediante la rutina *Postprocessing* de RELION que determina de forma automática un *B-factor* que aplicar al mapa de criome, ponderado por la curva de la FSC. Los valores obtenidos de *B-factor* para cada mapa se encuentran en la tabla 2.

	TR-TLP	NTR-TLP	DLP	vDLPA	vDLPD	vDLPI
<b>Microscopio</b>	Titan Krios	Titan Krios	Titan Krios	Titan Krios	Titan Krios	Titan Krios
<b>Voltaje (kV)</b>	300	300	300	300	300	300
<b>Detector</b>	Falcon III	Falcon II	Falcon III	Falcon III	Falcon III	Falcon III
<b>Modo</b>	Lineal	Lineal	Lineal	Lineal	Lineal	Lineal
<b>Magnificación</b>	58,000	59,000	58,000	59,000	58,000	58,000
<b>Dosis total (<math>e^-/\text{Å}^2</math>)</b>	39.9	42.0	42.0	58.5	41.94	30.0
<b>Dosis/frame (<math>e^-/\text{Å}^2</math>)</b>	1.33	1.68	0.84	1.50	0.84	0.75
<b>Rango desenfoque (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	-0.75, -3.01	-0.75, -3.0	-0.25, -2.5	-0.75, -2.5	-0.75, -2.75	-0.75, -2.75
<b>Tamaño de pixel (Å)</b>	1.43	1.34	1.40	1.35	1.35	1.44
<b>Micrografías (no.)</b>	2368	1465	6336	4480	7698	4432
<b>Partículas iniciales (no.)</b>	28427	11221	94253	85747	32343	42572
<b>Partículas finales (no.)</b>	22394	10815	91727	84926	29713	39468
<b>Simetría</b>	I2	I2	I2	I2	I2	I2
<b>Resolución (Å)</b>	3.48 Å	3.40 Å	3.04 Å	3.42 Å	3.5 Å	3.7 Å
Umbral FSC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>Rango de resolución (Å)</b>	3.01-4.06	3.00-4.20	3.01-4.0	3.25-5.20	3.31-4.60	3.30-5.60
<b>Coefficiente de correlación de la máscara</b>	0.84	0.79	0.72	0.81	0.79	0.76
<b>B factor (Å<sup>2</sup>) del mapa corregido</b>	-160	-135.6	-163.94	LocDeblur	LocDeblur	LocDeblur
<b>Composición de modelo (subunidad asimétrica)</b>						
Átomos que no son hidrógeno	82,170	82,097	54,048	54,048	54,015	52,075
Residuos de la proteína	10,273	10,264	6,743	6,743	6,746	6,804
<b>ADP (B-factors)</b>						
min	63.12	56.5	54.7	75.54	73.26	60.46
max	265.35	119.74	87.12	343.41	130.99	180.88
mean	102.17	83.32	27.23	203.03	93.12	101.16
<b>Desviaciones r.m.s.</b>						
Longitudes de enlace (Å)	0.007	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006
Ángulos de enlace (°)	0.871	0.918	0.856	0.968	1.049	1.044
<b>Validación</b>						
MolProbity score	1.59	1.77	1.36	2.20	2.24	2.23
Clashscore	4.51	7.43	3.46	25.39	16.39	18.72
Rotámeros no permitidos (%)	0.28	0.12	0.10	0.13	0.22	1.05
<b>Gráfico de Ramachandran</b>						
Favorecido (%)	94.77	94.76	96.59	95.55	90.96	85.96
Permitido (%)	5.16	5.18	3.34	4.36	8.83	13.89
Atípicos (%)	0.07	0.06	0.07	0.09	0.21	0.15

**Tabla 2.** Condiciones de adquisición y procesamiento digital para cada una de las muestras estudiadas

De forma adicional, se determinó la resolución local de cada mapa con la rutina *MonoRes* de Xmipp (Vilas et al., 2018) (De la Rosa-Trevín et al., 2013) y este resultado se utilizó para corregir las amplitudes en el mapa original en función de la resolución local calculada mediante el programa *LocalDeblur* de Xmipp (Ramírez-Aportela et al., 2020). Este método de compensación local es

especialmente conveniente para mapas que presentan un amplio rango de resolución, como en el caso de algunas de las reconstrucciones estudiadas. Por último, y con el fin de conseguir un mapa corregido que permita una mejor visualización de las densidades para el posterior modelado estructural de la estructura atómica, se implementó el método *LocSpiral* (Kaur et al., 2020). *LocSpiral* permite mejorar la resolución y la interpretación de los mapas mediante la generación de un mapa 3D corregido a partir de la obtención de un nuevo mapa de amplitudes filtrado y normalizado en función del umbral de ruido encontrado alrededor en el entorno de nuestro mapa inicial y dentro de un rango de resolución proporcionado. En cada caso, se seleccionó el mapa con la corrección de amplitudes que mejor nos permitía realizar procesos sucesivos de modelado atómico. En algunos casos se trabajó con una combinación de ellos para conseguir un trazado de la cadena atómica adecuado (Fig. 10).

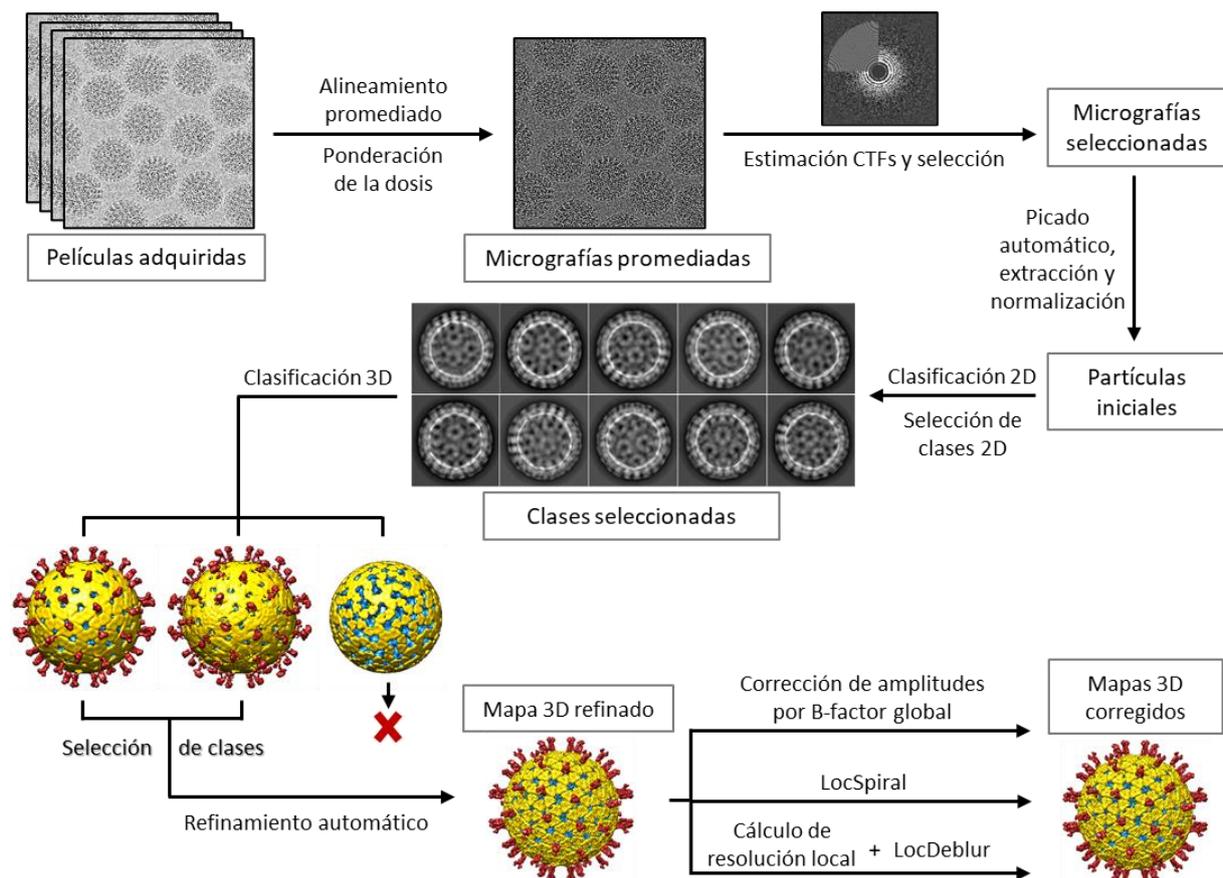


Figura 10. Metodología del procesamiento digital de las imágenes de partículas de rotavirus.

Los perfiles de densidad radial promedio de las cápsidas se calcularon con el paquete Xmipp, y fueron normalizados y escalados adecuadamente. Las subunidades asimétricas de las partículas de rotavirus, tanto nativas como VLP, fueron segmentadas mediante el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) o el programa Xmipp (*ExtractUnitCell*) (De la Rosa-Trevín et al., 2013; Sorzano et al., 2013).

### 3.5.3.2 Determinación de la estructura de la espícula de VP4

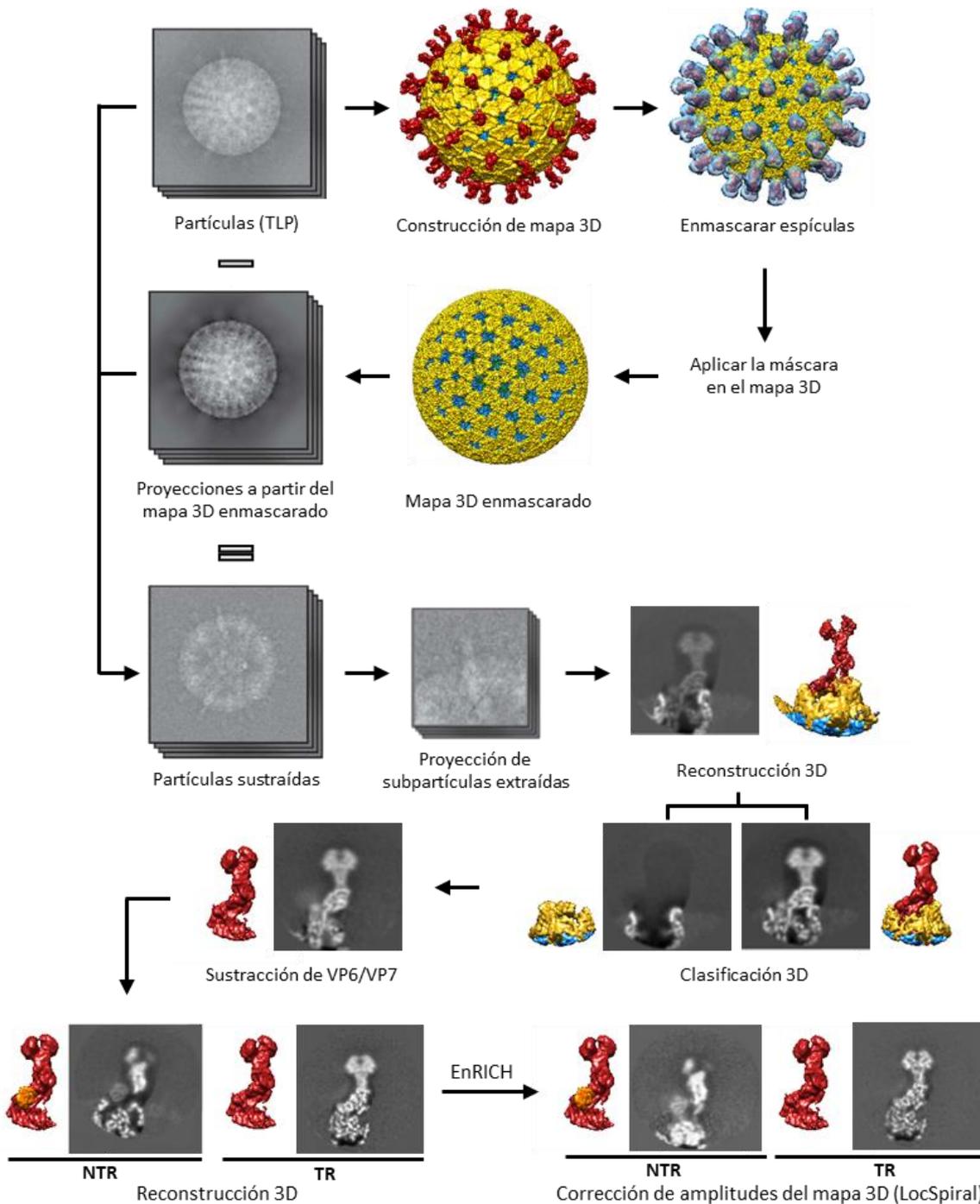
En el caso de virus icosaédricos, se han propuesto diferentes métodos computacionales para abordar estos desajustes de simetría (Morais MC, Tao Y, Olson NH, Grimes S, Jardine PJ, Anderson DL, Baker TS, 2001; Briggs et al., 2005; Huiskonen et al., 2007). En el caso de la espícula de RV, como primer paso se utilizó el método de reconstrucción localizada (*localized reconstruction*) (Ilca et al., 2015) para las espículas en ambos mapas. Este método permite la generación de mapas 3D de regiones específicas que presentan problemas de flexibilidad, simetría u ocupancia y se encuentran englobadas en complejos macromoleculares mayores. Estas regiones, denominadas a partir de ahora subpartículas, son tratadas como partículas aisladas, facilitando así su clasificación y posteriores pasos de refinamiento y 3DR. De forma resumida, se substrajo de las partículas originales de las TLP la contribución de las capas de VP2, VP6 y VP7 utilizando el mapa de densidades de la correspondiente TLP y una máscara que engloba estas tres capas. Posteriormente, considerando la posición de las espículas de cada TLP en la reconstrucción 3D final, así como la simetría icosaédrica de la misma, se calculó la posición de cada espícula en la proyección 2D y dichas posiciones fueron extraídas de las imágenes de diferencia calculadas (Fig. 11). A partir de este punto, todas las subpartículas se trataron como partículas individuales en la clasificación 3D, refinamiento y reconstrucción.

La posterior clasificación 3D de las subpartículas de las espículas de TLP generadas en ausencia (espículas NTR) y presencia de tripsina (espículas TR) reveló en ambos casos una clase con una clara densidad correspondiente a VP4 y otra clase en la que la densidad de VP4 estaba ausente (Fig. 11), siendo la densidad circundante correspondiente a la capa de VP7 y VP6 similar en ambas clases. A continuación, el mapa 3DR de la clase en la que la densidad de VP4 estaba ausente y que contenía los componentes que no forman parte de la espícula se utilizó para generar una máscara y restar la densidad que no forma parte de la espícula del mapa con la densidad de la VP4 (Fig. 11). En el caso de espículas NTR, se realizó una segunda clasificación 3D para separar subpartículas con una densidad asociada al dominio lectina de VP4-C. A continuación, se reconstruyeron los mapas 3D de ambas espículas NTR y TR. Aunque la reconstrucción 3D localizada de las espículas permitió una mejora en la resolución en comparación con el mapa VP4 original calculado antes de la clasificación, dicha mejora no fue suficiente para poder realizar su trazado atómico.

Por ello, se implementó un segundo paso de mejora de la densidad de la espícula mediante el método computacional EnRICH (*Resolution Improvement in Conformational Heterogeneity maps*) (Kazemi et al., 2021). Este método transforma las partículas desde su conformación inicial a una conformación establecida de referencia. Para ello, se realizaron los siguientes pasos sucesivos: 1) clasificación 3D en 6 clases para obtener diferentes conformaciones del mapa y partículas asociadas a ellas; 2) refinamiento 3D de cada clase para obtener las asignaciones angulares precisas de cada partícula; 3) traslocación de las partículas con diferentes conformaciones a una de referencia mediante un proceso de flujo óptico y

4) alineamiento y reconstrucción 3D del conjunto de todas las partículas con la nueva conformación con una mejor resolución, contraste y relación señal-ruido (Fig. 11).

Como paso final, se aplicó el algoritmo LocSpiral (Kaur et al., 2020) para mejorar la interpretabilidad de estos mapas de alta resolución, mientras se previenen las distorsiones del mapa ocasionadas por la aplicación de un B-factor global a todo el conjunto del mapa.



**Figura 11. Metodología del procesamiento digital para la obtención de las estructuras a resolución atómica de las espículas de TLP de rotavirus.**

### 3.5.3.3 Ajuste de estructuras atómicas en mapas de microscopía y manipulación de modelos atómicos

Para el trazado de las cadenas polipeptídicas correspondientes a la cepa de rotavirus SA11 en estudio, se generó un modelo por homología de cada cadena polipeptídica (VP2, VP4, VP6 y VP7) que forma la subunidad asimétrica de la cápsida usando como referencia la estructura atómica de la TLP de rotavirus RRV (PDB: 4V7Q; (Settembre et al., 2011)). Para ello, se ajustó el PDB de referencia en el mapa de densidad y se generaron las cadenas por homología con el programa Modeller (Šali & Blundell, 1993). La generación de este modelo se llevó a cabo usando el programa UCSF Chimera mediante la alineación de secuencias por pares. De igual manera, se empleó este método para la generación de un primer modelo de las estructuras atómicas de RVD y RVI. Una vez se generaron cada una de las cadenas que forman la subunidad asimétrica, estas se ajustaron de nuevo como un cuerpo rígido en el mapa de densidad con el programa Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, (Pettersen et al., 2004)].

Posteriormente se realizó un refinamiento automático en espacio real del modelo atómico en el mapa de densidad con el programa PHENIX (Adams et al., 2010). Mediante el programa Coot (Emsley & Cowtan, 2004) se construyeron y refinaron de forma local y manual las cadenas polipeptídicas para ajustarlas a la densidad experimental. Finalmente, se llevaron a cabo rondas de refinamiento y validación iterativa del modelo utilizando los programas Coot y PHENIX (tabla 2). En cada caso, la calidad del modelo y la correcta geometría de la estructura atómica fue validada a través de las estadísticas determinadas por Molprobit (Chen et al., 2010).

### 3.5.3.4 Alineamiento de secuencia y estructural de las partículas de RV

Los alineamientos de secuencia por parejas establecidas entre la DLP y vDLP estudiadas y las proteínas VP2 y VP6 fueron realizados a partir del servidor Clustal Omega (Sievers et al., 2011) y analizadas mediante el servidor ESPript (ESPrpt - <https://esprpt.ibcp.fr>; (Robert & Gouet, 2014)).

Con el fin estudiar la posible presencia de residuos conservados en las múltiples estructuras y comparar las estructuras secundarias de las diferentes partículas estudiadas, se realizaron alineamientos estructurales con el programa Dali (Holm et al., 2006; Holm & Rosenström, 2010). El valor z-score refleja la similitud estructural entre ambas secuencias, así, valores más altos indican mayor similitud; mientras que el valor de la desviación cuadrática media (rmsd) indica la probabilidad de que el alineamiento sea incorrecto, de manera que valores más bajos indican mayor fiabilidad. Este análisis ha permitido evaluar la conservación de residuos y dominios concretos entre las estructuras analizadas.

### 3.5.3.5 Análisis de las superficies de contacto e interacciones intermoleculares entre modelos atómicos

La superficie de contacto entre las diferentes proteínas de la partícula icosaédrica, así como las interacciones intermoleculares entre los diferentes monómeros entre sí y las interacciones polares e

hidrofóbicas fueron analizadas mediante la herramienta Find Clashes/Contact implementada en el programa USCF Chimera.

### **3.6 Procesamiento de imágenes**

La edición fotográfica digital se realizó empleando los siguientes paquetes informáticos: Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc.) e Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las representaciones gráficas fueron generadas con el programa Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, (Pettersen et al., 2004)].

## *Resultados*

---

#### 4.1. Determinación de la estructura atómica del virión de RV

La simetría icosaédrica intrínseca a las capas formadas por VP2, VP6 y VP7 ha facilitado su estudio a alta resolución mediante criome, sin embargo, la caracterización estructural de la espícula viral está limitada por su flexibilidad y por el hecho de que en TLP purificadas (Dayue Chen & Ramig, 1992; Ilca et al., 2015; Rodríguez et al., 2014; Settembre et al., 2011) o DLP recubiertas con VP4 y VP7 (Trask & Dormitzer, 2006) no se encuentran espículas en todas las posiciones en las que de forma ideal se deberían encontrar. El estudio y comparación de la estructura de espículas no procesadas y procesadas nos puede ayudar a comprender el papel del procesamiento proteolítico en el paso de un estado no infectivo a su estado competente para la entrada celular.

##### 4.1.1. Purificación y análisis por criomicroscopía electrónica de TLP

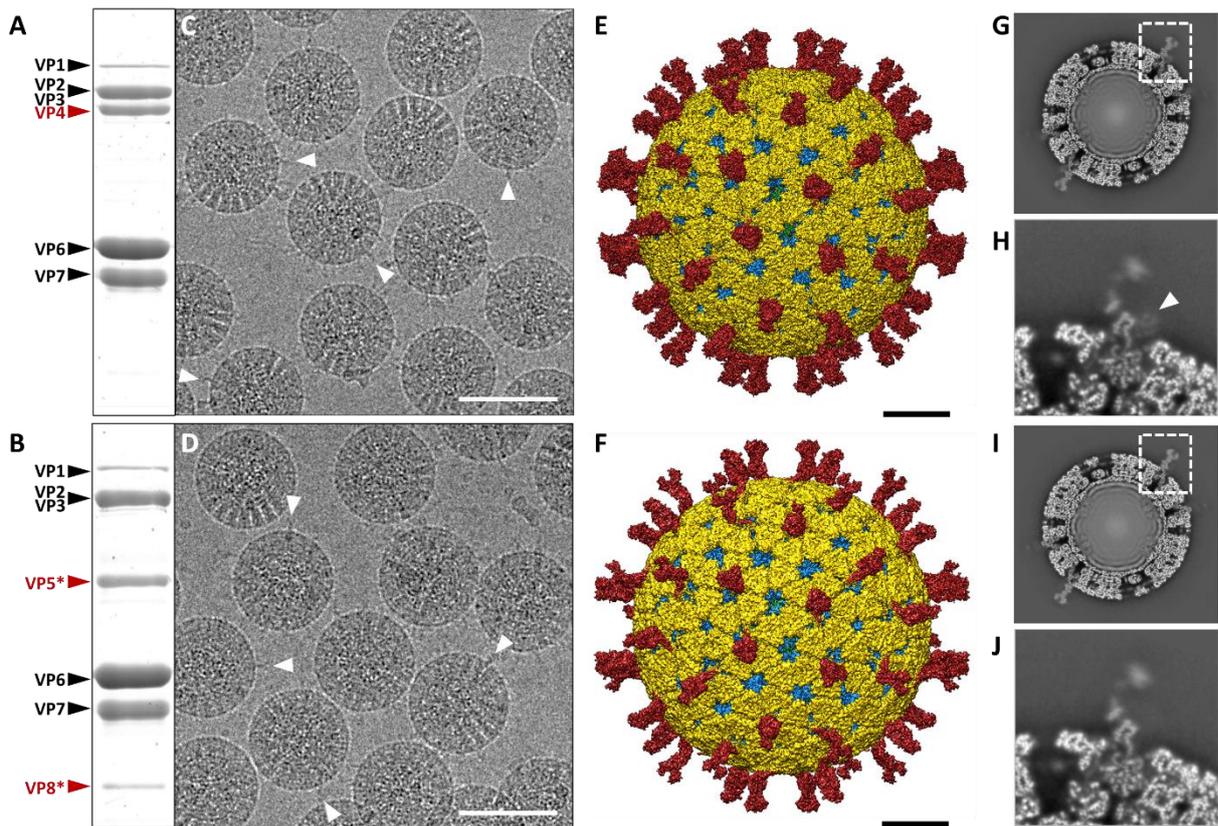
Con el fin de producir TLP en las cuales las proteínas que conforman las espículas estuvieran procesadas, o no procesadas, se infectaron células MA104 con la estirpe SA11 del RVA en presencia (TR-TLP) y en ausencia (NTR-TLP) de tripsina, respectivamente (Rodríguez et al., 2014). Las partículas generadas durante la infección fueron purificadas mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad y analizadas bioquímicamente mediante SDS-PAGE. Este análisis mostró en ambas purificaciones un alto grado de pureza sin observarse otras bandas que aquellas correspondientes a las proteínas estructurales que conforman la TLP (Fig. 12A, B). Cabe destacar que, mientras que en NTR-TLP sólo observamos una única banda correspondiente a la proteína de la espícula, VP4, en TR-TLP se observan las dos bandas correspondientes a sus formas procesadas VP5\* y VP8\*.

Tras verificar la pureza, homogeneidad e integridad estructural de las partículas purificadas mediante tinción negativa y ME, éstas fueron vitrificadas y analizadas mediante criome (Fig. 12C, D y tabla 2). Las imágenes de criome muestran una población homogénea de partículas isométricas con la característica morfología en forma de rueda (Settembre et al., 2011), en las que en algunos casos es posible detectar espículas protruyendo hacia el exterior (puntas de flecha, Fig. 12C, D). A partir de las imágenes de criome se seleccionaron 11,221 y 28,350 partículas de NTR- y TR-TLP, respectivamente. Estas imágenes fueron analizadas mediante clasificación 2D y posterior clasificación 3D, con imposición de simetría icosaédrica. Como resultado se seleccionaron 11,221 y 24,660 partículas cuyas 3DR fueron refinadas hasta una resolución final de 3.40 Å y 3.48 Å para NTR-TLP y TR-TLP, respectivamente (Fig. 12E, F).

La arquitectura observada en ambas partículas corresponde a la descrita anteriormente para la partícula infectiva de RVA (Settembre et al., 2011a; Rodríguez et al., 2014): tres capas proteicas icosaédricas de las que protruyen espículas y en cuyo interior se observa la polimerasa VP1, así como el genoma viral como una densidad ordenada en capas concéntricas en cortes transversales del mapa 3D obtenido (Fig. 12E, F, G, I). La estructura 3D de las espículas de TLP de RVA generadas en ausencia (espículas NTR) y presencia de tripsina (espículas TR) muestra una densidad promediada similar en ambos casos. Sin

embargo, las espículas NTR son ligeramente más cortas y engrosadas que las espículas TR (Fig. 12E, F) y presentan, además, una tenue densidad adicional en la base del tallo (Fig. 12G-J) compatible con el dominio de lectina de la subunidad C previamente descrito en estas partículas (Rodríguez et al., 2014).

La densidad electrónica media en las espículas en el mapa de las NTR- y TR-TLP fue un 65% menor a la encontrada el resto de la cápsida, es decir, en las capas de VP2, VP6 y VP7 (Fig. 12 G-J). La resolución alcanzada en la base de las espículas es mayor y al alejarse radialmente va disminuyendo (Fig. 12H, J; Fig. 13A-B). Esta disminución en la resolución podría atribuirse al movimiento cimbreado de las espículas (Rodríguez et al., 2014) cuya movilidad también aumentaría radialmente según nos alejamos de la partícula.



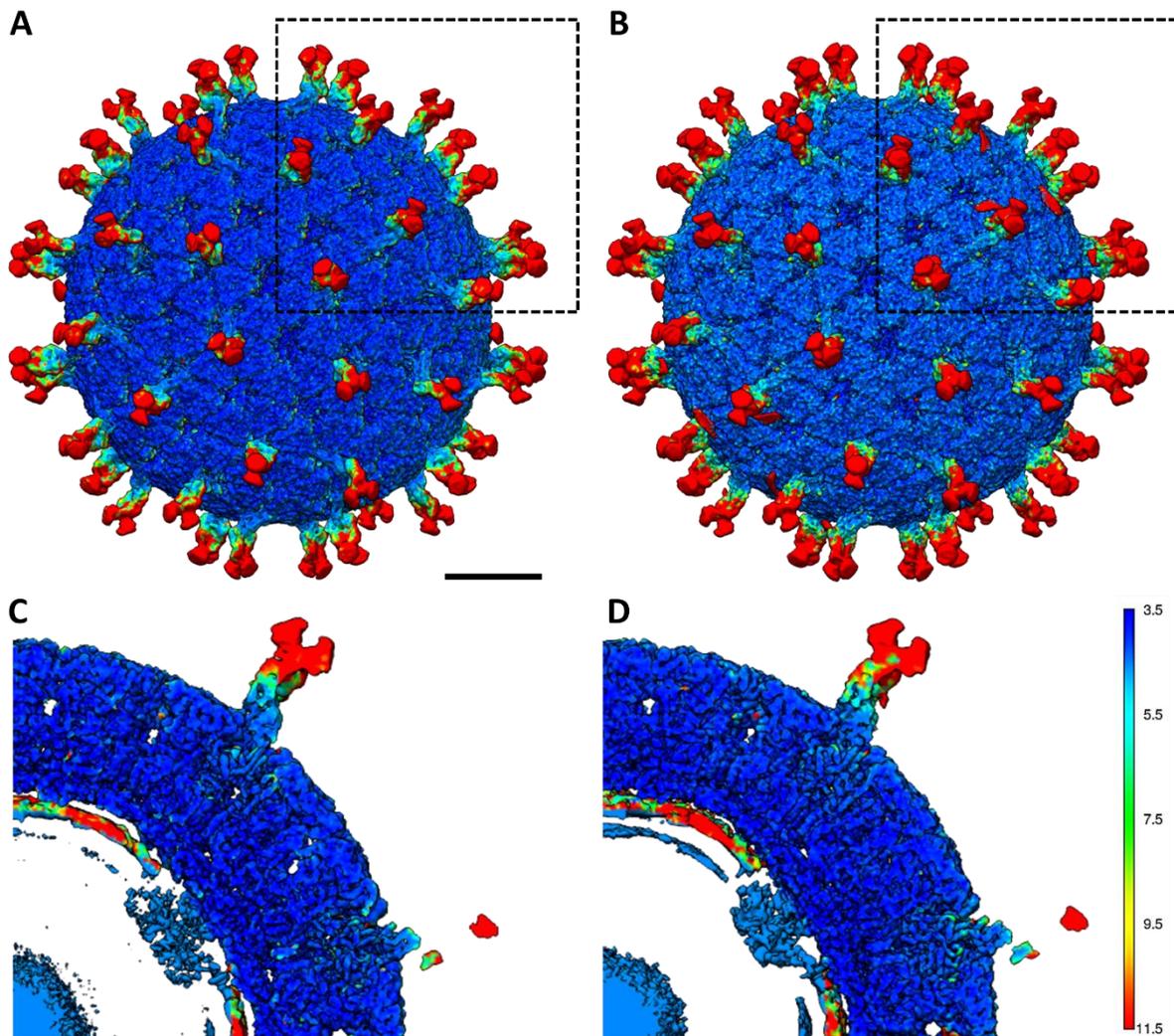
**Figura 12. Análisis de RV SA11 NTR- y TR-TLP por SDS-PAGE y criomicroscopía electrónica.** (A, B) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de TLP purificadas, cultivadas en ausencia (A) o presencia (B) de tripsina. Se indican las posiciones de las proteínas estructurales (VP) de RV. (C, D) Micrografías crioelectrónicas de NTR- (C) y TR-TLP (D). Se indica con puntas de flecha blancas la posición de algunas espículas proyectadas desde la superficie de las partículas. La barra representa 100 nm. (E, F) Representación de la estructura tridimensional de las partículas NTR- (E) y TR-TLP (F) vistas a lo largo del eje icosaédrico de simetría 2. La barra representa 100 Å. Las superficies están representadas radialmente mediante el código de colores: espículas VP4 o VP8\*/VP5\* (rojo), VP7 (amarillo), VP6 (azul) y VP2 (verde). La densidad se contornea a  $2\sigma$  por encima de la media. (G, I) Secciones transversales de los mapas de NTR- (G) y TR-TLP (I), paralelas a la sección central, vistas a lo largo del eje icosaédrico de simetría 2. Se indica con un cuadrado discontinuo las densidades correspondientes a las espículas proyectadas desde la superficie de las partículas. (H, J) Vista cercana de las espículas NTR (H) y TR (J) indicadas en D e I. Se indica con una punta de flecha el dominio lectina de la cadena C en espículas NTR (H).

#### 4.1.2. Análisis estructural de la espícula de NTR- y TR-TLP

Los avances tecnológicos y computacionales de los últimos años han permitido la obtención de estructuras a resolución atómica o cuasi atómica de complejos macromoleculares altamente ordenados mediante la aplicación de técnicas de crioME (Cheng, 2015). Sin embargo, algunas subunidades de estos complejos macromoleculares pueden presentar una mayor flexibilidad, poseer una simetría diferente al resto del complejo o estar presentes en cantidades subestequiométricas, lo que limita el estudio a alta resolución de estas regiones y empeora la resolución global del mapa.

El estudio estructural por crioME de las capas de VP2, VP6 y VP7 de TLP permite llegar a resolver mapas a una alta resolución debido a la simetría icosaédrica en dichas capas (Settembre et al., 2011). La resolución local (Fig. 13A-B) encontrada en nuestros mapas de densidad para las capas de VP2, VP6 y VP7 de NTR- y TR-TLP fue de 3.0-4.2 Å y 3.0-4.4 Å, respectivamente, lo que permitió realizar el trazado directo de sus estructuras atómicas. Sin embargo, la caracterización estructural de la espícula viral está limitada por su flexibilidad y por el hecho de que en TLP purificadas no se encuentran espículas en todas las posiciones en las que de forma ideal se deberían encontrar, lo que hace que la resolución local en las espículas, especialmente baja en las regiones del cuerpo y la cabeza (Fig. 13C-D), sea insuficiente para construir un modelo atómico de estas. Partiendo de estos datos, encontramos necesario la generación de una metodología computacional que permita caracterizar a alta resolución la espícula de RV en su estado inactivo y activada por proteasas. Dicha metodología se desarrolló en colaboración con los Drs. Javier Vargas Balbuena y Josué Gómez Blanco (Universidad Complutense de Madrid) aplicando diferentes métodos computacionales a las densidades obtenidas por crioME.

Como primer paso, tras el refinamiento de las TLP, se utilizó el método de reconstrucción localizada (*localized reconstruction*) descrito por Ilca y colaboradores (Ilca et al., 2015) según el protocolo indicado en el apartado 2.6.3.2. Este método permite extraer de cada partícula original las proyecciones correspondientes a las 60 posiciones equivalentes de las que protruyen las espículas que rodean la partícula. La extracción de estas proyecciones permite trabajar con subpartículas de VP4 de forma independiente, sin contar con el resto de la cápsida. La 3DR de las subpartículas extraídas mostró una menor señal y resolución en comparación con la reconstrucción de VP4 del original de las TLP (Fig. 14A-B, *localized reconstruction*; Fig. 12H, J). Mediante una clasificación 3D se separaron las subpartículas correspondientes a posiciones ocupadas y no ocupadas por espículas (Fig. 14A-B, posiciones ocupadas y vacías, respectivamente). Esta clasificación permitió determinar que un 59% de las posiciones se encuentran ocupadas por espículas en el caso de las NTR-TLP y un 37% en el caso de las TR-TLP. A continuación, se utilizó la 3DR de las posiciones no ocupadas con el fin de sustraer el entorno formado por VP6 y VP7 de las subpartículas ocupadas por espículas (Fig. 14A-B, entorno sustraído).



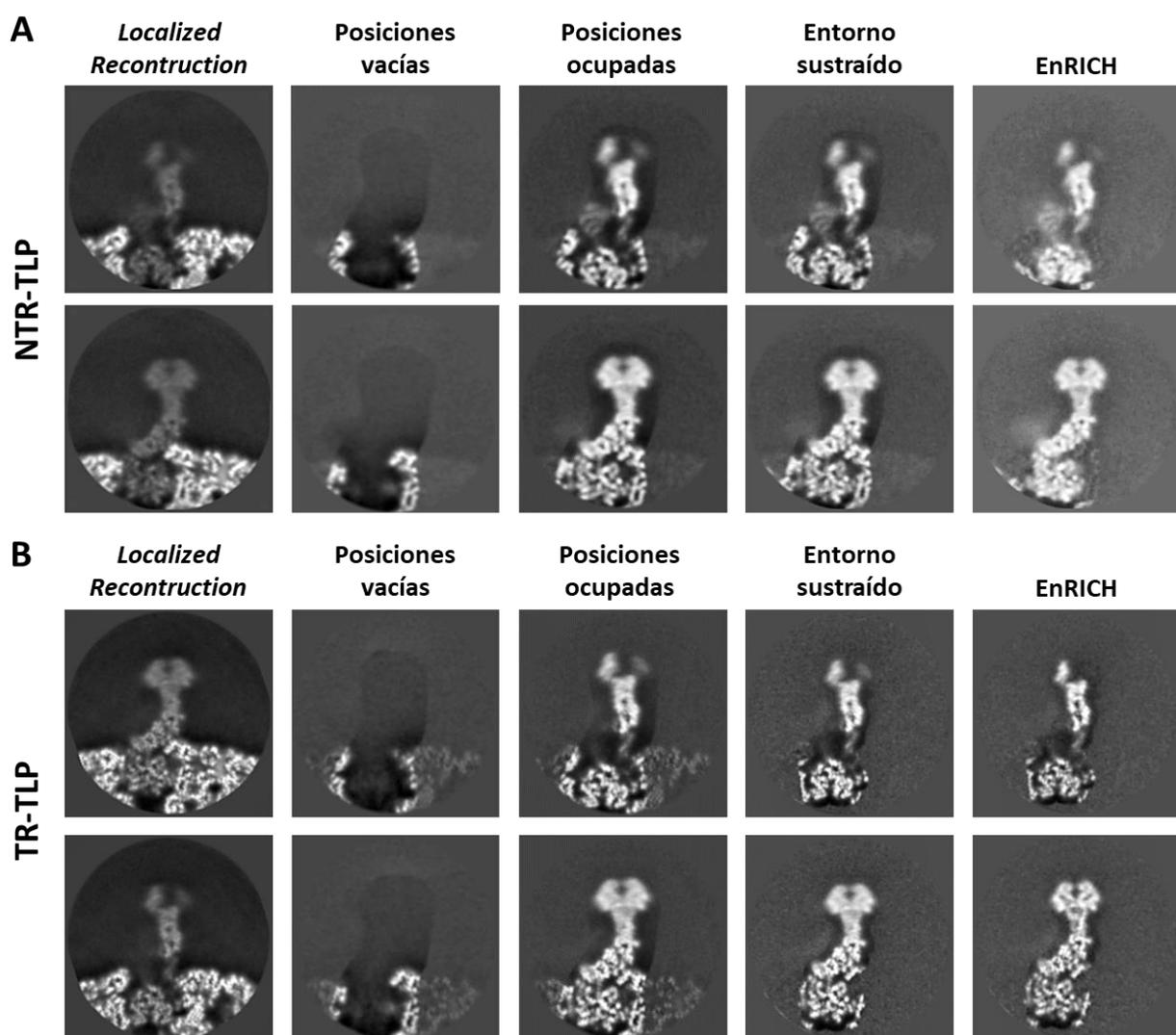
**Figura 13. Análisis de la resolución local de los mapas 3D obtenidos de la NTR- y TR-TLP.** (A-B) Representación de los mapas 3D de la partícula NTR- (A) y TR-TLP (B) vistos a lo largo del eje icosaédrico de simetría 2. Se indican con un cuadrado discontinuo las densidades observadas en los paneles C y D. (C-D) Vista cercana de secciones transversales NTR- (C) y TR-TLP (D) de cada mapa 3D. Las secciones son paralelas, pero desplazadas 14.7Å desde la sección central de los mapas. Las superficies están coloreadas de acuerdo con la resolución local calculada para cada 3DR. Se muestra el código de color con las correspondientes resoluciones en Å. Las densidades se contornean a  $2\sigma$  por encima de la media. La barra de escala representa 100 Å.

Sin embargo, aunque este proceso mejoró significativamente la calidad de la densidad de ambos tipos de espículas, su resolución no fue suficiente para poder realizar su trazado atómico.

Con el fin de obtener mapas a una mayor resolución se aplicó el método *EnRICH* (Fig. 14A-B, *EnRICH*) (Kazemi et al., 2021). Este método consta de una serie de pasos sucesivos: 1) clasificación 3D de las subpartículas correspondientes a posiciones ocupadas para obtener diferentes clases 3D y las partículas asociadas a ellas, 2) refinamiento de cada clase 3D para obtener las asignaciones angulares precisas de cada subpartícula, 3) selección de una de las clases como mapa de referencia y aplicación de la técnica *optical flow* para cada una de las subpartículas del resto de clases 3D. Esta técnica permite el cálculo de la distancia y movimiento de cada pixel de cada subpartícula con respecto al mapa de referencia

seleccionado para, posteriormente, realizar la traslocación de las subpartículas con diferentes conformaciones a la conformación de referencia, 4) alineamiento y reconstrucción 3D del conjunto de todas las subpartículas con la nueva conformación.

El análisis de la resolución local de los mapas obtenidos tras aplicar el método *EnRICH* mostró un aumento significativo de la resolución, contraste y relación señal-ruido en las regiones del tallo, cuerpo y cabeza para ambas espículas, siendo algo mayor en el caso de las espículas TR (Fig. 14A-B, *EnRICH*). Con el fin de mejorar la interpretabilidad de los mapas, evitando la aplicación de un *B-factor* global que pueda distorsionar los mapas haciendo que las densidades conectadas parezcan rotas y desconectadas, se aplicó el algoritmo *LocSpiral* (Kaur et al., 2020). Las densidades finales obtenidas presentaron una calidad y resolución suficiente para la construcción de un modelo completo de la espícula.



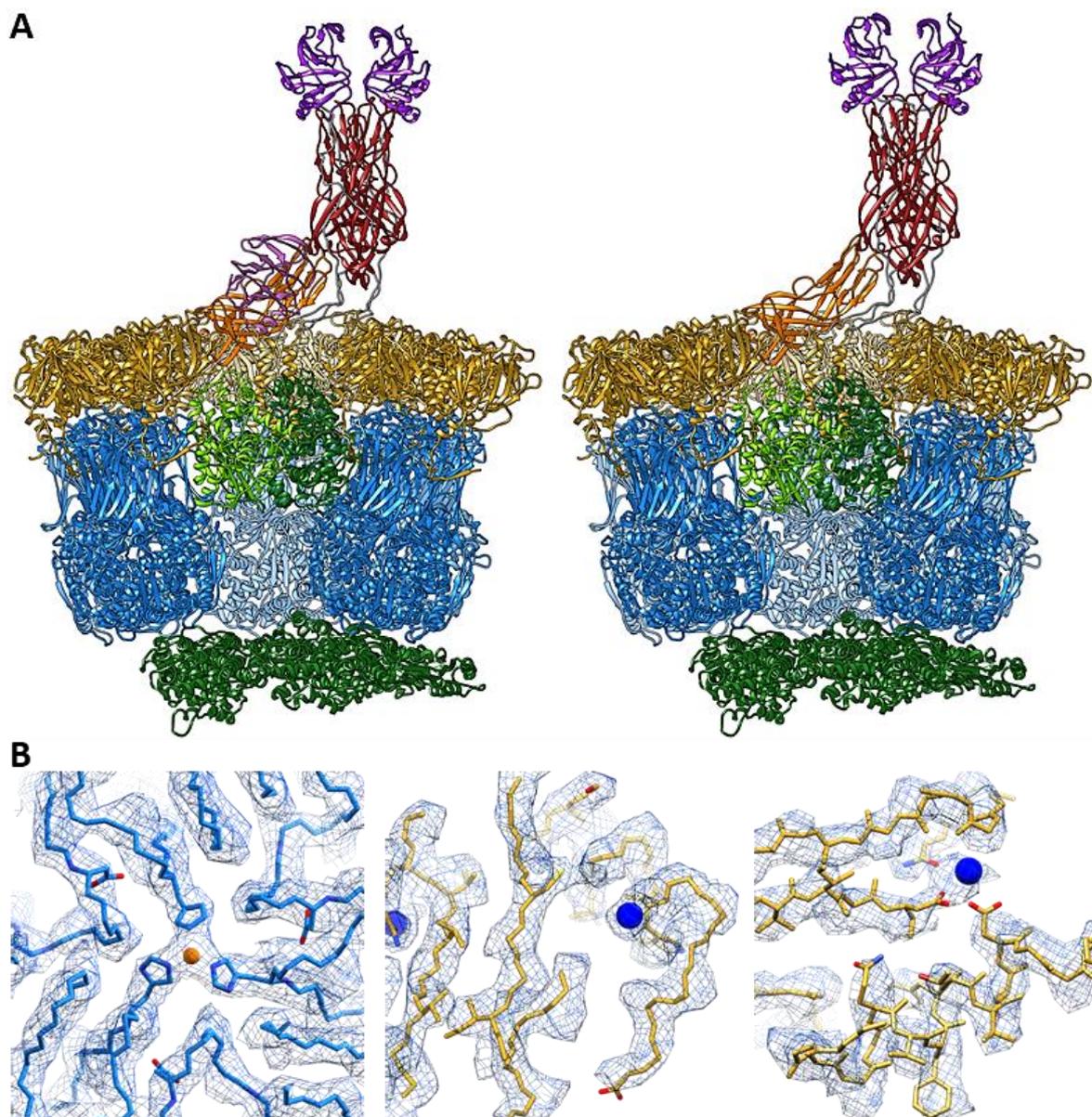
**Figura 14.** Análisis de la resolución local de las espículas en las diferentes etapas del refinamiento de las subpartículas de NTR-TLP y TR-TLP. Secciones transversales de 1.34 Å de espesor de los mapas obtenidos en las diferentes etapas de refinamiento de las subpartículas VP4 NTR (A) y TR (B). Los paneles muestran secciones de cada mapa 3D paralelas a la sección central de los mapas y desplazadas 14.7Å (paneles superiores) y 6.7Å (paneles inferiores).

#### 4.1.3. Construcción y análisis de un modelo atómico de TR-TLP y NTR-TLP

Como punto de partida para el trazado del modelo atómico de NTR- y TR-TLP se utilizó la estructura de la TR-TLP de la cepa RRV de RVA (PDB 4V7Q, 6WXE) (Settembre et al., 2011b). Este modelo fue inicialmente ajustado de forma manual en nuestros mapas de densidad con el programa Chimera (Pettersen et al., 2004). El ajuste fue muy preciso, lo que indica una gran homología estructural entre el modelo atómico de referencia y nuestros mapas, lo que era de esperar dado el elevado grado de identidad observado entre las secuencias de ambas cepas (anexo 2 y 3, alineamientos de las secuencias aminoacídicas de VP2, VP6, VP7 y VP4 de RRV y SA11)

A partir de la estructura atómica de referencia se generaron modelos atómicos por homología para cada una de las cadenas polipeptídicas de VP2, VP4, VP6 y VP7 que forman parte de la subunidad asimétrica. Las cadenas generadas se ajustaron inicialmente como un cuerpo rígido y posteriormente de manera local. A continuación, se llevó a cabo un refinamiento de forma iterativa en espacio real de la subunidad asimétrica del mapa. La calidad del modelo y la correcta geometría de la estructura atómica fue validada mostrando unos datos que indican la correcta conformación adoptada tanto por la cadena polipeptídica como por las cadenas laterales de la mayor parte de los residuos de la proteína (tabla 2). Parámetros como el bajo porcentaje de rotámeros no permitidos, el bajo número de choques no deseados entre átomos, el gráfico de Ramachandran, así como la elevada correlación entre el modelo y el mapa de crio-*ME* apoyan la validez de dichos modelos (tabla 2). La observación de las estructuras atómicas obtenidas de TLP sin tratar o tratadas con tripsina sólo mostró diferencias significativas en la estructura de la espícula (Fig. 15A). Como esperábamos, las estructuras atómicas de la cápsida (VP2, VP6 y VP7) para la NTR- y TR-TLP (Fig. 15A) son semejantes entre ellas y similares a la descrita anteriormente para la TR-TLP de RRV (Settembre et al., 2011b), con la que muestra una identidad del 90% y de la que sólo se conoce su forma tripsinizada. El alineamiento de las cadenas VP2, VP6 y VP7 entre la TR-TLP y la estructura de RRV, respectivamente, mostró unos valores rmsd de 1.1, 0.6 y 0.9, lo que denota un gran solapamiento a nivel estructural así como un alto grado de similitud entre ambas estructuras atómicas.

La capa de VP2 se organiza con una arquitectura T=1 en la que cada subunidad asimétrica está formada por un dímero de VP2 (VP2A, VP2B). Ambas subunidades se ensamblan de forma que sus extremos amino terminales se localizan hacia el interior de la partícula. VP2A se dispone formando un complejo en forma de estrella alrededor del eje de simetría 5, en torno al cual se ensamblan cinco monómeros VP2B adicionales formando una estructura decamérica. Sobre esta capa de VP2, se disponen trímeros de VP6 formando una segunda cápsida con simetría T=13. Finalmente, encontramos trímeros de VP7 ensamblados en fase sobre los trímeros de VP6 subyacentes. Los residuos amino terminales de VP7 forman un brazo N-terminal (residuos 58-62) que interacciona con una cadena  $\beta$ 4 del dominio *jelly-roll* de VP6. A pesar de que cada trímero VP7 delimita con un trímero de VP6, los contactos en esa interfaz



**Figura 15. Análisis de las estructuras atómicas de SA11 NTR- y TR-TLP.** (A) Estructura atómica de la subunidad asimétrica de NTR-TLP (panel izquierdo) y TR-TLP (panel derecho). Las cadenas VP2 se representan de verde oscuro, VP6 de azul y VP7 de amarillo. Las cadenas A, B y C de las espículas VP4 o VP8\*/VP5\* están representadas con distintas tonalidades y colores en función de los dominios que la forman: pie (verde claro para la cadena A, verde para la cadena B y verde oscuro para la C), cuerpo (rojo (A, B), naranja (C)), cabeza o dominios lectina (morado (A, B), rosa (C)). Los bucles de unión entre los diferentes dominios se representan en gris. (B) Secciones del mapa de densidad de NTR-TLP (semejante al de TR-TLP) con su estructura atómica ajustada. El panel izquierdo muestra un corte transversal del trímero de VP6 en el que se observa una densidad central coincidente con el ion Zn<sup>2+</sup> coordinado por cada una de las histidinas (153H) que forman el trímero. Los paneles central y derecho muestran detalles ampliados de las regiones de VP7 donde se encuentran densidades coincidentes con las posiciones de átomos Ca<sup>2+</sup> que estabilizan la estructura. En todos los paneles se representan algunas cadenas laterales como indicadores de la resolución alcanzada en los mapas.

son mínimos. La interacción entre VP7 y VP6 está casi exclusivamente mediada por el brazo N-terminal, pero esta región no sólo interacciona con la cadena de VP6 subyacente, sino que los residuos N-terminales podrían interactuar con la cadena VP7 vecina formando una red de interacciones que contribuiría a la estabilidad la capa exterior del RV. Además de las interacciones antes descritas, el trímero de VP6 se encuentra estabilizado por un ion Zn<sup>2+</sup> (Jayaram et al., 2004; Mathieu et al., 2001)

coordinado entre los monómeros que lo forman (Fig. 15B, panel izquierdo), mientras que dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  estabilizan cada una de las superficies de interacción entre subunidades de VP7 (Fig. 12B, panel central y derecho) (Aoki et al., 2009; Dormitzer et al., 2000). La presencia de iones de calcio, más allá de estabilizar los trímeros VP7, al encontrarse intercalados entre ambas las capas de VP6 y VP7, podría intervenir en el ensamblaje de la cápsida y mantener las interacciones electrostáticas entre la superficie interna de la capa de VP7 y la superficie externa de VP6 (Jiménez-Zaragoza et al., 2018).

El modelo atómico obtenido para la espícula TR (Fig. 16B, panel inferior) presenta un plegamiento muy similar al descrito para la espícula procesada de RRV (apartado 1.2, VP4) (Fig. 4 y 16B, panel inferior) (Herrmann et al., 2020). Además de caracterizar la estructura atómica de la espícula tratada con tripsina de SA11, el presente trabajo permitió resolver la estructura de esta espícula no activada por tripsina (Fig. 16B, panel superior).

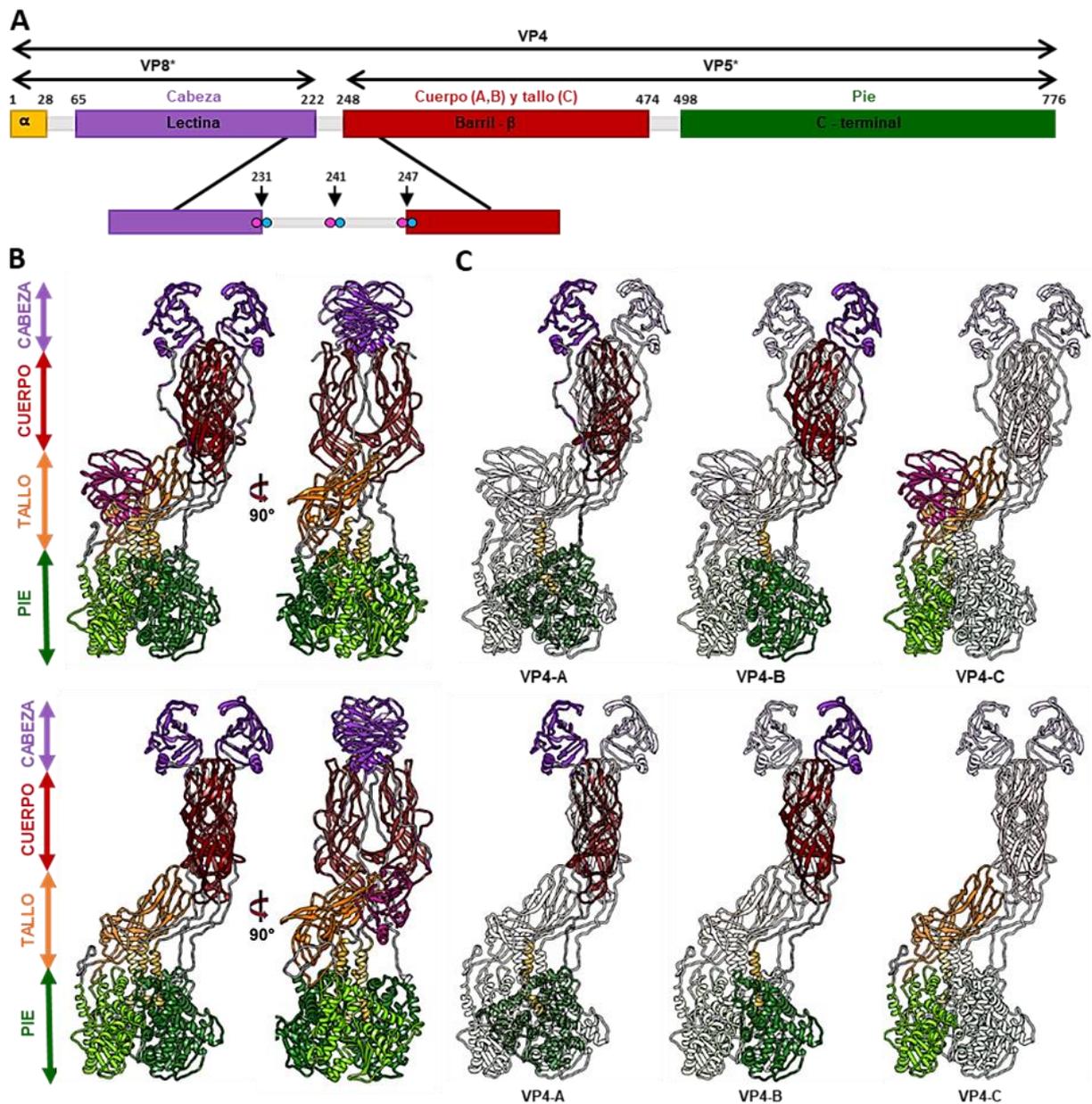
Las espículas, NTR y TR, sólo se diferencian en el procesamiento, por tripsina, de las cadenas VP4 que las forman, y, únicamente se encontraron diferencias estructurales entre ambas relacionadas con este procesamiento proteolítico. Mientras que la 3DR de la espícula TR no presenta ninguna densidad para el dominio lectina de la subunidad C, en la 3DR de la espícula NTR pudimos observar este dominio resuelto junto al tallo de la espícula (VP8\*C, rosa) (Fig. 16B). Además, en el caso de las espículas TR, la incubación con tripsina produce el procesamiento proteolítico del bucle  $\alpha 3$ - $\beta 13$  en tres residuos específicos: R231, R241 y R247 (Fig. 16A) (Arias et al., 1996) con la consecuente escisión de cada cadena VP4 en dos subproductos, VP8\* (28 kDa, aa 1–247) y VP5\* (60 kDa, aa 248–776) durante la etapa de activación en el ciclo de infección.

La superposición de las estructuras atómicas de ambas espículas, NTR y TR, permite observar una ligera expansión de la espícula tras su activación con tripsina, que se traduce en un desplazamiento de los diferentes dominios de la espícula TR con respecto a la posición relativa de los mismos dominios en la espícula NTR. Este movimiento aumenta a medida que nos alejamos de la base de la espícula (Fig. 17A). La desviación cuadrática media entre las cadenas de carbono  $\alpha$  de los dominios del pie es de 1.2 Å, mientras que para los dominios del cuerpo y la cabeza de las espículas la desviación es de 2.1 Å y 3.8 Å, respectivamente. Esto muestra un mayor movimiento en el dominio de la cabeza, seguido por el cuerpo de la espícula (Fig. 17B) y una mínima variación en la posición del pie entre ambas estructuras.

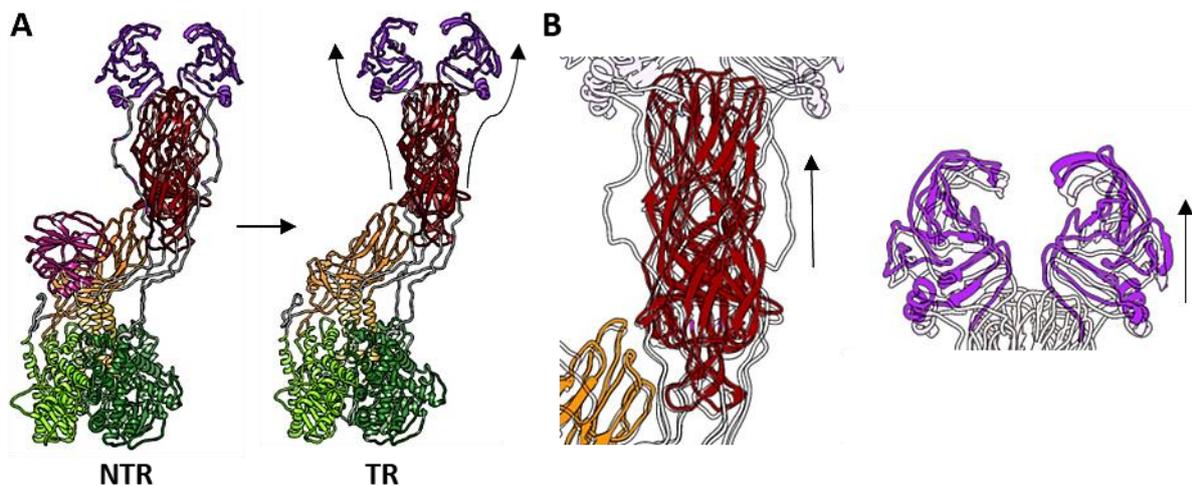
La conservación estructural observada en los dominios lectina de las cadenas A y B de las espículas NTR y TR (Fig. 16) (Herrmann et al., 2021; Settembre et al., 2011), en los que se mantienen expuestos los sitios de unión a glicanos, explicaría por qué la capacidad de unión a la célula es independiente del estado de procesamiento proteolítico de la espícula (S. M. Clark et al., 1981).

La 3DR de la espícula NTR permitió el trazado de toda la cadena polipeptídica de las subunidades A y B incluyendo los dos largos bucles que conectan los dominios lectina de la cabeza con el resto de la

molécula: el bucle interno  $\alpha 2-\beta 1$  que conecta la región  $\alpha$  con los dominios lectina y el bucle externo  $\alpha 3-\beta 13$ , que los une al cuerpo de la espícula (Fig. 18A, panel superior izquierdo y central).



**Figura 16. Estructura atómica de la espícula de RV.** (A) Esquema de la estructura primaria y organización de dominios de VP4: dominios  $\alpha$  (amarillo), lectina (magenta),  $\beta$  barril (rojo) y C-terminal (verde). Se indican los residuos que delimitan los dominios y los sitios de escisión de tripsina (R231, R241, R247). (B). Estructura atómica de la espícula NTR (panel superior) y TR (panel inferior). Cada dominio se nombra y representa siguiendo un mismo patrón de color: pie (verde), tallo (naranja), cuerpo (rojo), cabeza (violeta) y dominio lectina VP4-C (rosa, espícula NTR). (C) Se muestra de forma resaltada cada una de las subunidades de VP4 (A, B, C), de NTR-TLP (panel superior) y TR-TLP (panel inferior).



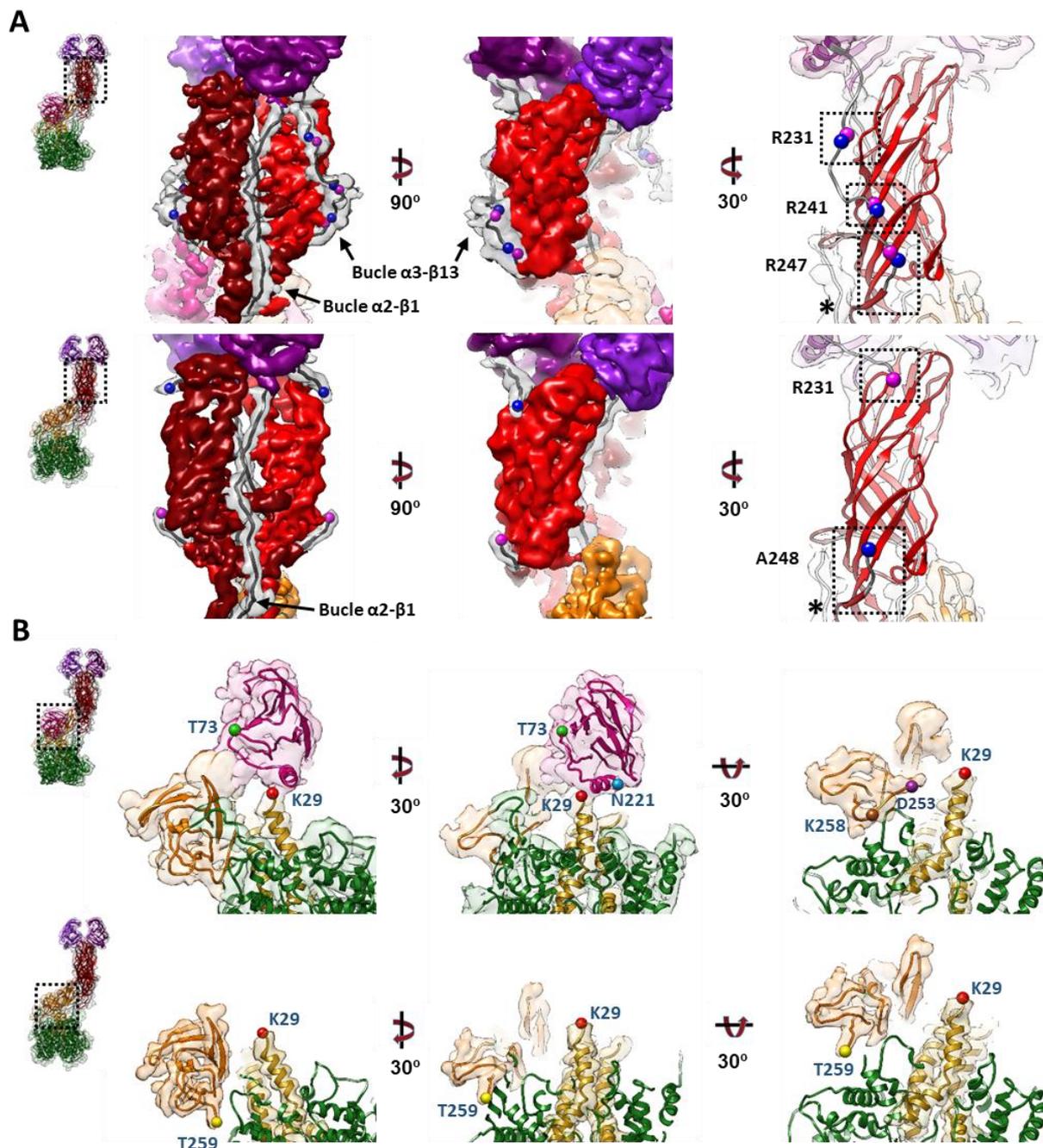
**Figura 17. Representación de la expansión de la estructura de la espícula tras su activación.** (A) Se representan las estructuras atómicas coloreadas por dominios de la espícula NTR y TR, indicando con flechas, en la espícula TR, el movimiento de la espícula producido tras su activación. (B) Vista ampliada de las estructuras atómicas del dominio del cuerpo (izquierda) y de la cabeza (derecha) de la espícula NTR (transparente) y TR (coloreadas por dominios) solapadas. Los dominios de la espícula se representan en diferentes colores: pie (verde), tallo (naranja), cuerpo (rojo), cabeza (violeta).

Los extremos amino de los bucles externos  $\alpha 3\text{-}\beta 13$  mantienen contactos con la cadena contraria que forma el cuerpo de la espícula, probablemente favoreciendo la estabilidad de estos bucles expuestos. Por otro lado, las regiones carboxilo terminales de cada bucle  $\alpha 3\text{-}\beta 13$  median un intercambio molecular con el dominio barril- $\beta$  del cuerpo de la cadena contraria (Fig. 18A, panel derecho).

En el caso de las espículas TR, la incubación con tripsina se traduce en el procesamiento proteolítico de los bucles  $\alpha 3\text{-}\beta 1$ . Ambos bucles presentan dos cortes abruptos en la densidad del mapa en los residuos R231 y A248, (Fig. 18A, panel inferior izquierdo y central) así como una retracción de los extremos amino de los bucles escindidos, que continúan manteniendo los contactos con la cadena contraria, pero con una región precedente a la anterior zona de contacto (Fig. 18A, panel inferior izquierdo y central). De forma específica, la interacción del extremo amino terminal del bucle está mediada por los residuos 225-231 con los residuos 443-448 del dominio barril- $\beta$  del cuerpo de la cadena contraria. En la espícula TR se mantiene el intercambio molecular entre las regiones carboxilo terminales de los bucles  $\alpha 3\text{-}\beta 13$  de cada cadena, A y B, y el dominio barril- $\beta$  del cuerpo de la cadena contraria. La interacción de este bucle con la  $\beta$ -lámina ( $\beta 14$ ) de la región del cuerpo de la cadena contraria forma la  $\beta$ -lámina  $\beta 13$  (Fig. 18A, asterisco, panel superior derecho). Este intercambio molecular, por lo tanto, se conserva en ambas espículas, no activada y activada, y podría contribuir a la estabilidad de la estructura de la espícula.

El mapa de la espícula NTR mostró una densidad adicional en la base de la espícula que permitió el trazado del dominio lectina de la cadena C desde la T73 (Fig. 18B, panel superior, esfera verde) hasta la N221 (esfera azul). Sin embargo, no se observó ninguna densidad en los bucles que unen ambos extremos del dominio lectina con el resto de la cadena: el bucle amino desde la K29 (Fig. 18B, panel superior, esfera roja) de la región  $\alpha$  amino-terminal hasta la T73 (esfera verde) y el bucle carboxilo desde la N221 (esfera azul) a la D253 (esfera morada) en el dominio barril- $\beta$  del tallo. Dado que el

análisis bioquímico de las NTR-TLP (Fig. 12A) indica que la proteína VP4 no está procesada, la ausencia de densidad para ambos bucles está probablemente relacionada con un alto grado de flexibilidad en estas regiones.



**Figura 18. Análisis de la estructura atómica de diferentes dominios de las espículas NTR y TR.** Detalles las cadenas atómicas, ajustadas a su mapa de densidad, ampliados de los recuadros indicados en los paneles izquierdos. Dentro de cada panel, A y B, la fila superior hace referencia a la espícula NTR-VP4 y la inferior a la espícula TR-VP4. (A) Se representa de forma ampliada el cuerpo de la espícula y los bucles tripsinizados (TR-VP4) o sin tripsinizar (NTR-VP4). Se indican los residuos R231, R241, R247 en esferas rosas y los residuos adyacentes, N232, D242, A248, en azul. Asimismo, se indica el bucle  $\alpha 2-\beta 1$ , el bucle  $\alpha 3-\beta 13$  y el intercambio molecular observado en el dominio  $\beta$ -barril del cuerpo con un asterisco (\*). (B) Se representa de forma ampliada la región del tallo, dominio lectina de la cadena VP4C y pie de la espícula. Se indican diferentes residuos como esferas: K29 (rojo), T73 (verde), N221 (azul), K258 (marrón), D253 (morado), T259 (amarillo).

El mapa de densidad obtenido de la espícula TR permitió el trazado de la cadena C desde el extremo amino terminal hasta la K29 del bucle  $\alpha$ 2- $\beta$ 1 (Fig. 18B, panel inferior, esfera roja). No se observó ninguna densidad electrónica entre la K29 (Fig. 18B, panel inferior, esfera roja) y la T259 (esfera amarilla) del dominio barril- $\beta$  del tallo. Esta región abarcaría la región del dominio lectina y los bucles que lo unen al dominio  $\alpha$  y al dominio barril- $\beta$  del tallo. El análisis bioquímico de las TR-TLP (Fig. 12B) indica una completa digestión proteolítica de la espícula, por lo que es posible que la incubación con tripsina haya producido un corte en un bucle expuesto en el aminoácido K258 (Fig. 18B, panel superior izquierdo, esfera marrón) en el dominio barril- $\beta$  del tallo, pudiéndose realizar el trazado de la cadena C sólo hasta la T259 (Fig. 18B, panel inferior izquierdo, esfera amarilla).

El análisis conjunto de los mapas de las espículas NTR y TR mostró que el tratamiento de las espículas con tripsina se traduce en la proteólisis de los bucles externos de las cadenas A y B que unen los dominios lectina al cuerpo de la espícula y en el desprendimiento del dominio lectina en la cadena C.

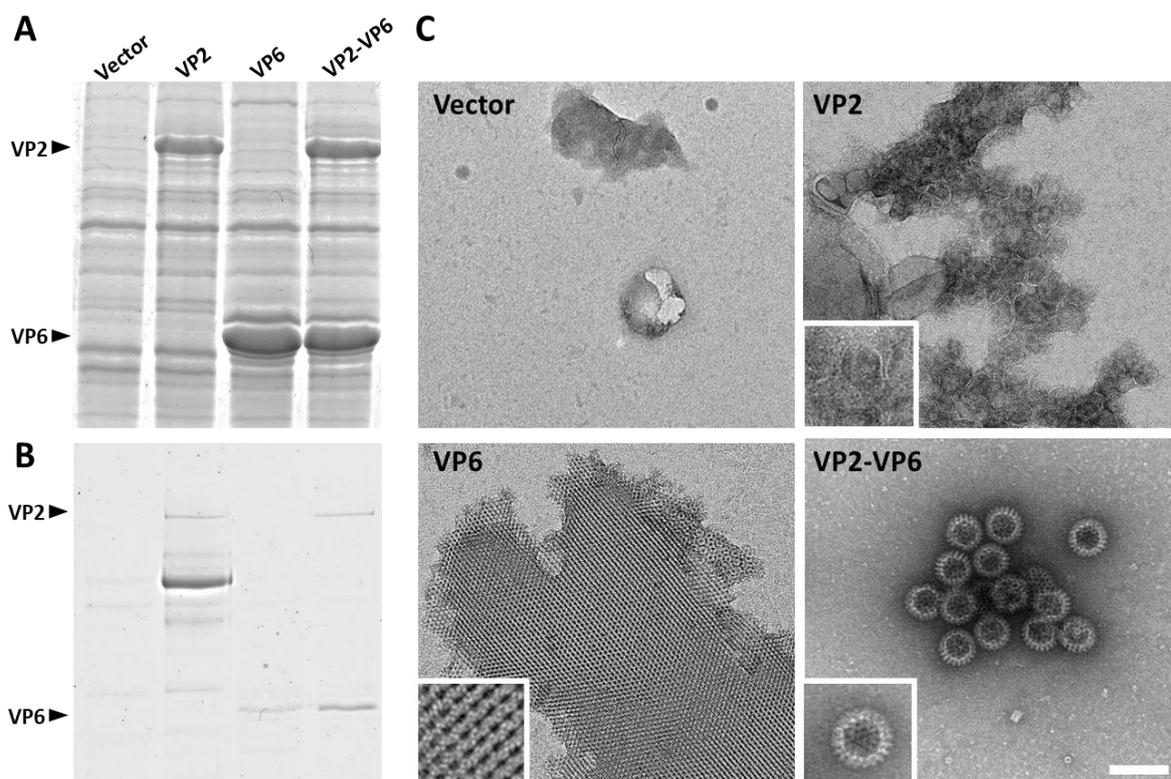
## 4.2. Caracterización estructural de vDLP de RVA

Una de las principales hipótesis de este trabajo es que las vDLP producidas en sistemas heterólogos reproducen fielmente la estructura de la DLP producida durante la infección. Aunque hay estudios mediante microscopía electrónica que apoyan esta hipótesis (S E Crawford et al., 1994; Labbé et al., 1991; Zeng et al., 1996b), para verificarla decidimos determinar la estructura atómica de la vDLP de la estirpe de SA11 de RVA producida en el sistema de baculovirus, uno de los sistemas de expresión más empleados para la producción de vDLP y vTLP de rotavirus (S E Crawford et al., 1994; Zeng et al., 1996b), y compararla con la estructura de la DLP natural.

### 4.2.1. Expresión y purificación de vDLP de RVA

En el BEVS la coexpresión de VP2 y VP6 de RVA permite el ensamblaje de vDLP que son liberadas al sobrenadante del cultivo de forma eficiente (S E Crawford et al., 1994; Peixoto et al., 2007). Aunque es posible la obtención de vDLP mediante la coinfección con rBV monocistrónicos (Palomares et al., 2012), el uso de rBVs policistrónicos permite superar las limitaciones inherentes a la coinfección, permitiendo obtener una mayor producción de vDLP (Vieira et al., 2005). Para la producción de vDLP de RVA se empleó un baculovirus policistrónico (rBV-VP2/VP6) basado en el plásmido pFastBacDual (Invitrogen) en el cual el gen de la VP6 se expresa bajo el control del promotor de la polihedrina, y el gen VP2 bajo el control del promotor de la proteína p10 (Harris & Polayes, 1997). Como controles se emplearon rBV monocistrónicos que expresan independiente las proteínas VP2 (rBV-VP2) y VP6 (rBV-VP6) basados en el mismo plásmido, bajo el control de los mismos promotores que en la construcción dual. Además, se generó un rBV como control de infección que contiene el plásmido vector vacío (rBV-vector).

Para la generación y propagación de los rBV se utilizó la línea celular Sf9. Con el fin de analizar la expresión de las proteínas VP2 y VP6 así como la capacidad de estos rBV para la formación de vDLP se utilizó la línea celular H5, que ha sido previamente empleada en la producción de estas vDLP (Davis et al., 1993; Fernandes et al., 2013; Rhiel et al., 1997; Wickham et al., 1992). Para ello, se infectaron células H5 que fueron recogidas, junto con el sobrenadante de infección, a las 120 hpi. Los extractos celulares analizados bioquímicamente mediante SDS-PAGE presentaban una banda mayoritaria de ~120 kDa en células infectadas con rBV-VP2, una banda de ~45 kDa en células infectadas con rBV-VP6 y ambas bandas en células infectadas con rBV-VP2/VP6 (Fig. 19A), lo que coincide con los tamaños esperados para estas proteínas. El carril correspondiente a células infectadas con el rBV-vector mostró el mismo perfil electroforético a excepción de la presencia de las bandas correspondientes a las proteínas VP2 y VP6.



**Figura 19. Análisis de la expresión de proteínas VP2 y VP6 y formación de vDLP de RVA.** (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de extractos de células H5 infectadas con rBV (rBV-vector, rBV-VP2, rBV-VP6 y rBV-VP2/VP6). (B) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de los sedimentos tras la ultracentrifugación de los sobrenadantes de infección a través de un colchón de sacarosa al 25% (rBV-vector, rBV-VP2, rBV-VP6 y rBV-VP2/VP6). La cantidad de muestra cargada es 3 veces superior a la cargada en el panel A. Se indican en cada caso las posiciones de las proteínas estructurales (VP) de RV. En el caso de rBV-VP2, se observa la banda de VP2 así como una banda mayoritaria que podría corresponder a agregados de BSA bovina presente en el suero fetal bovino utilizado en el medio de cultivo. (C) Micrografías electrónicas de tinción negativa de los sedimentos obtenidos en (B). Las imágenes muestran campos representativos de cada tipo de muestra. En cada caso, se muestra de forma ampliada: una vSLP (panel VP2), una sección del paracrystal 2D (panel VP6) y una partícula vDLP (panel VP2-VP6). La barra de escala representa 100 nm.

Los sobrenadantes de infección fueron ultracentrifugados a través de un colchón de sacarosa al 25% y el sedimento obtenido fue analizado mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Fig. 19B). En cada caso se observó la presencia de las bandas correspondientes a las proteínas VP2, VP6 y VP2/VP6. En el caso de rBV-VP2 se aprecia una contaminación probablemente derivada de agregados de BSA bovina, una proteína que es muy abundante en el sobrenadante debido al 10% de suero fetal bovino que forma parte del medio de cultivo.

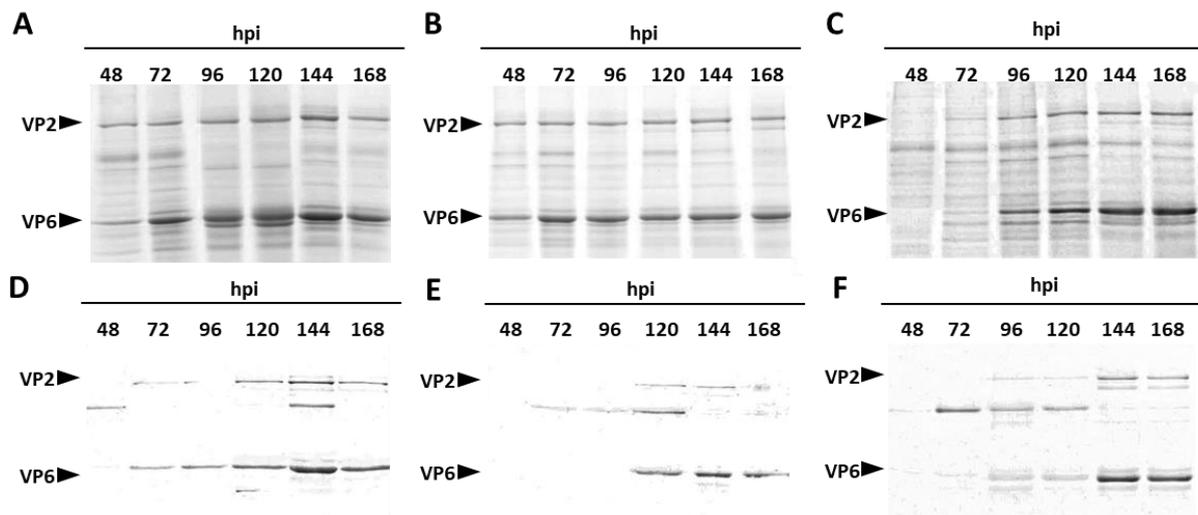
El análisis por tinción negativa mediante microscopía electrónica mostró la presencia de agregados similares a vSLP en el sobrenadante de células infectadas con rBV-VP2 (Fig. 19C, VP2). En el caso de células infectadas con rBV-VP6, se observó la presencia de paracrístales 2D que podrían corresponderse al ensamblaje de VP6 en paracrístales (Fig. 19C, VP6) (Mary K Estes et al., 1987; Reddy et al., 1992), ya que la proteína mayoritaria encontrada en el análisis por SDS-PAGE fue VP6 (Fig. 19B). Por último, la expresión conjunta de ambas proteínas dio lugar a la formación de vDLP estructuralmente íntegras en su mayoría. Las imágenes por ME con tinción negativa reflejaron la pureza y gran homogeneidad estructural de las vDLP purificadas, con un tamaño y morfología circular rugosa de ~70 nm de diámetro (Fig. 19C, VP2-VP6).

Una vez determinada la eficacia de este sistema para la generación de vDLP, se realizaron ensayos con el fin de determinar las condiciones más adecuadas para la obtención de estas, evaluando diferentes temperaturas de incubación, tiempos post-infección, líneas celulares y multiplicidades de infección.

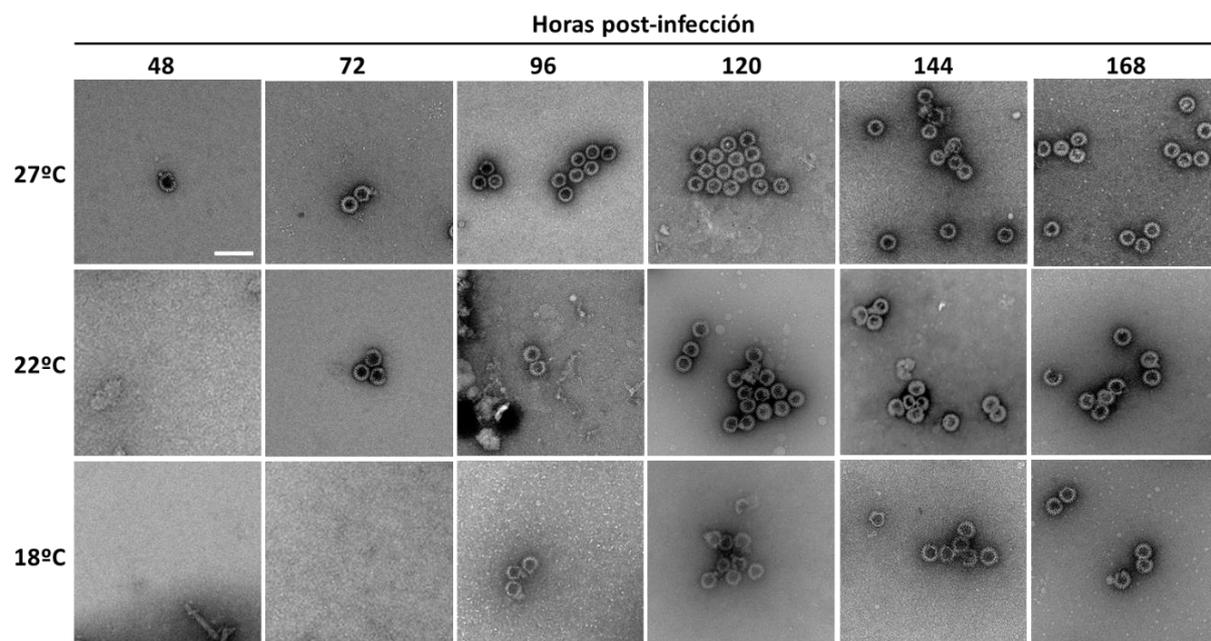
Se infectaron células H5 con rRV-VP2/VP6 y se analizó la expresión de las proteínas a diferentes temperaturas de incubación (27°C, 22°C y 18°C) a lo largo del tiempo (48, 72, 96, 120, 168 y 240 hpi) en los extractos celulares mediante SDS-PAGE. El análisis densitométrico de las bandas de dichos geles muestra que los tiempos post-infección con una mayor señal de VP2 y VP6 corresponden a 120-168 hpi a 27°C (Fig. 20A), 120-168 hpi a 22°C (Fig. 20B) y 144-168 hpi a 18°C (Fig. 20C). Entre ellos, se observó una mayor expresión de VP2 y VP6 en células incubadas a 27°C y recogidas a 144 hpi (Fig. 20A).

Con el fin de analizar la formación de vDLP en cada una de estas condiciones, los sobrenadantes de infección fueron sedimentados a través de un colchón de sacarosa al 25%. El análisis bioquímico muestra que la concentración de proteínas VP2 y VP6 en los sedimentos se corresponde con la encontrada en el análisis de los extractos celulares, siendo mayor a las 144-168 hpi cuando la infección se realiza a 27 °C (Fig. 20D), a las 144 hpi para 22°C (Fig. 20E) y a las 144-168 hpi cuando esa se realiza a 18°C (Fig. 20F).

El análisis por microscopía electrónica (Fig. 21, tabla 3) de estos sedimentos muestra la presencia de vDLP en una cantidad proporcional a la cantidad de VP2 y VP6 detectada en los geles. En todos los casos, las vDLP muestran una integridad estructural similar.



**Figura 20. Análisis de la expresión de las proteínas VP2 y VP6 de RVA en células H5.** (A, B, C) Análisis mediante SDS-PAGE de extractos celulares a diferentes tiempos post-infección mantenidas a 27°C (A), 22°C (B) y 18°C (C). (D, E, F). Análisis mediante SDS-PAGE de sedimentos obtenidos tras la ultracentrifugación de sobrenadantes de infección a diferentes tiempos post-infección en células mantenidas a 27°C (D), 22°C (E) y 18°C (F). Se indican las posiciones de las proteínas estructurales (VP) de RV.



**Figura 21. Análisis mediante microscopía electrónica de partículas purificadas de vDLP de RVA.** Micrografías electrónicas de tinción negativa de los sedimentos obtenidos tras ultracentrifugación de los sobrenadantes de infección de células infectadas a diferentes tiempos post-infección (48, 72, 96, 120, 144, 168 hpi) e incubadas a diferentes temperaturas (27°C, 22°C, 18°C). La barra de escala representa 100 nm.

Tª	Horas post-infección					
	48	72	96	120	144	168
27°C	+	+	++	+++	++++	+++
22°C	-	+	+	+++	++++	++
18°C	-	-	+	++	++	++

**Tabla 3. Cantidad de vDLP de RVA evidenciadas mediante microscopía electrónica a diferentes temperaturas de incubación a lo largo de diferentes tiempos post-infección.**

Con el propósito de identificar la línea celular con mayor potencial para la expresión de VP2 y VP6, y para la producción de vDLP a 27°C, se realizaron infecciones con rBV VP2/VP6 en las líneas celulares Sf9 y H5. Se analizaron los extractos y los sobrenadantes de infección recogidos a diferentes tiempos post-infección.

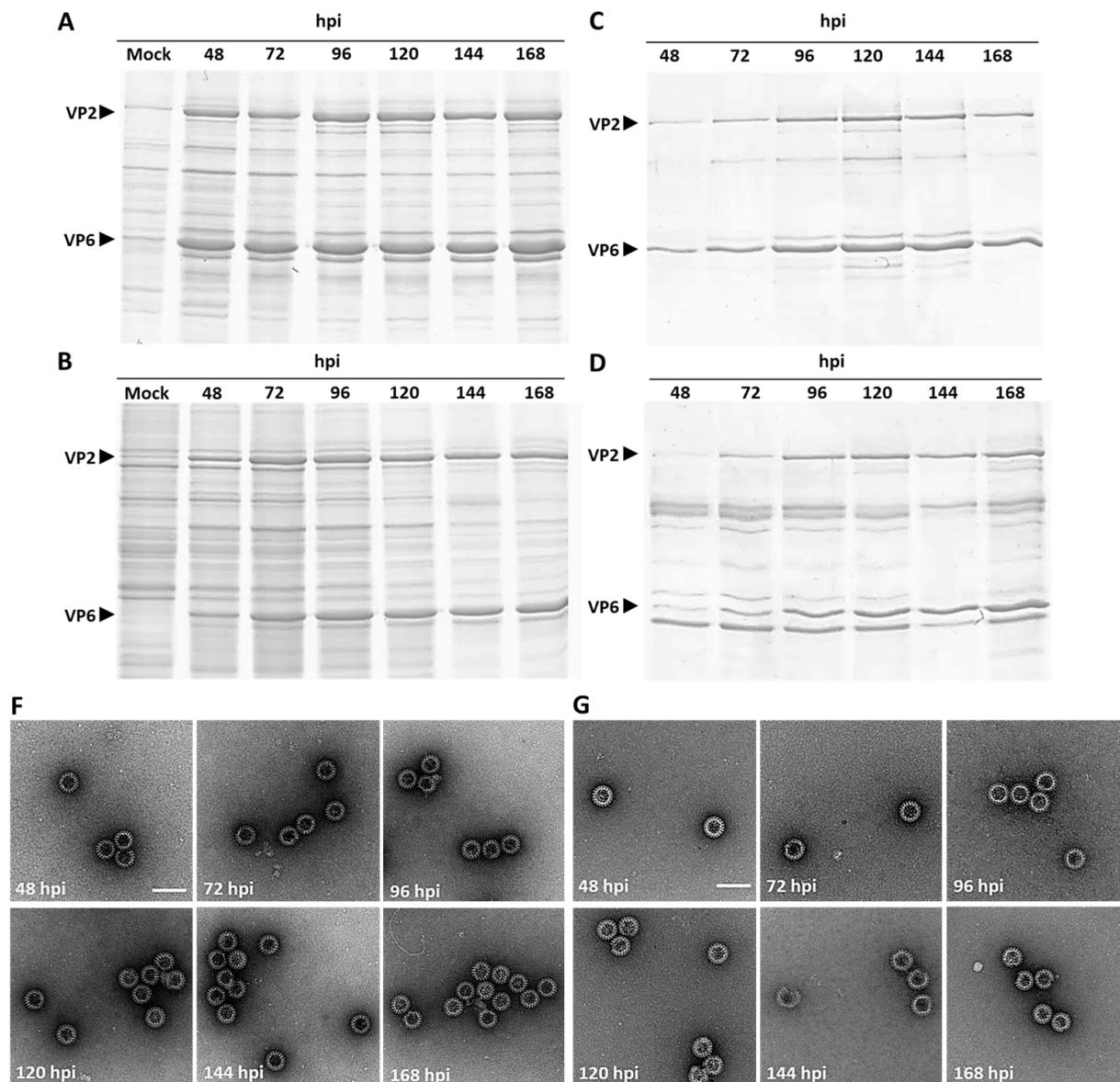
El análisis de los perfiles electroforéticos de los extractos celulares (Fig. 22A, C) y de los sobrenadantes de infección sedimentados a través de un colchón de sacarosa (Fig. 22B, D) muestra una mayor expresión de las proteínas recombinantes en la línea celular H5.

El análisis mediante tinción negativa de los sedimentos también permitió observar una mayor cantidad de partículas ensambladas en la línea celular H5 (Fig. 22F, G), con un máximo de partículas purificadas a partir de las 144-168 hpi. Estas partículas presentaban una alta pureza, así como una gran integridad estructural (Fig. 22F). Puesto que la incubación hasta las 168 hpi no aumenta significativamente la cantidad de vDLP producidas con respecto a 144 hpi, se eligió esta última como el tiempo post-infección óptimo para la expresión y preparación de vDLP.

Por último, empleando las condiciones de infección previamente determinadas se evaluó el efecto de la multiplicidad de infección en la expresión de las proteínas recombinantes. Se analizaron valores desde 0.3 hasta 4.0.

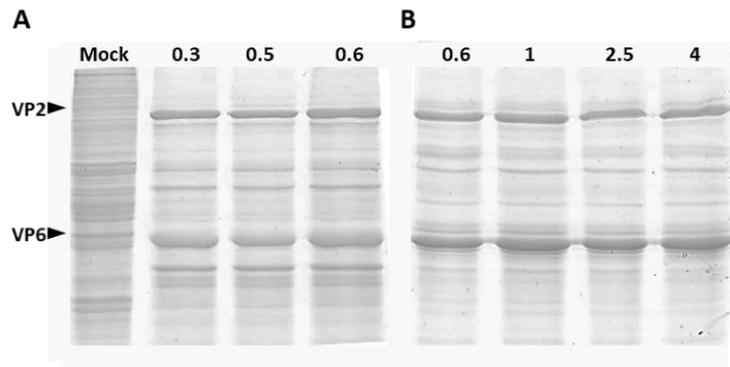
El análisis de los perfiles electroforéticos de los extractos celulares de dichas infecciones no mostró diferencias significativas en la expresión de las proteínas recombinantes entre ninguna de las condiciones empleadas (Fig. 23), por lo que se eligió la mínima multiplicidad de infección (0.3 ufp/célula) para la generación de vDLP.

A continuación, tras establecer las condiciones óptimas de infección para la expresión de vDLP (línea celular H5, temperatura de incubación de 27°C, tiempo de recogida de 144 hpi y multiplicidad de infección de 0.3), se llevó a cabo una infección a gran escala para la purificación y estudio por criME de estas vDLP. Tras 144 hpi se recogieron los cultivos de células H5 infectadas junto con los sobrenadantes de infección. El material particulado del sobrenadante se precipitó con PEG 8000 y se ultracentrifugó a través de un colchón de sacarosa al 25%.



**Figura 22. Comparación de la expresión y purificación de vDLP ensambladas en las líneas celulares H5 y SF9.** (A, B) Análisis bioquímico mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de los extractos de células H5 (A) y SF9 (B) infectadas con rBV-VP2/VP6 y recogidas a los diferentes tiempos post-infección indicados. Se indican las posiciones de las proteínas estructurales (VP) de RV. (C, D) Análisis bioquímico mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de los sedimentos obtenidos por ultracentrifugación del sobrenadante de infección de células H5 (C) y SF9 (D) infectadas con rBV-VP2/VP6 y recogidas a los tiempos post-infección indicados. (F, G) Micrografías electrónicas de tinción negativa de los sedimentos obtenidos tras ultracentrifugación de los sobrenadantes de infección de células H5 (F) y SF9 (G) y recogidos a los tiempos de infección indicados. La barra de escala representa 100 nm.

Finalmente, las vDLP obtenidas en el precipitado del colchón de sacarosa, fueron purificadas en un gradiente de densidad de CsCl<sub>2</sub>. El análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las vDLP obtenidas muestra únicamente dos bandas de proteína correspondientes a VP2 y VP6 (Fig. 24B). Las partículas se analizaron mediante microscopía electrónica con tinción negativa, y posteriormente criome (Fig. 24B), observándose vDLP homogéneas y con una buena integridad estructural.



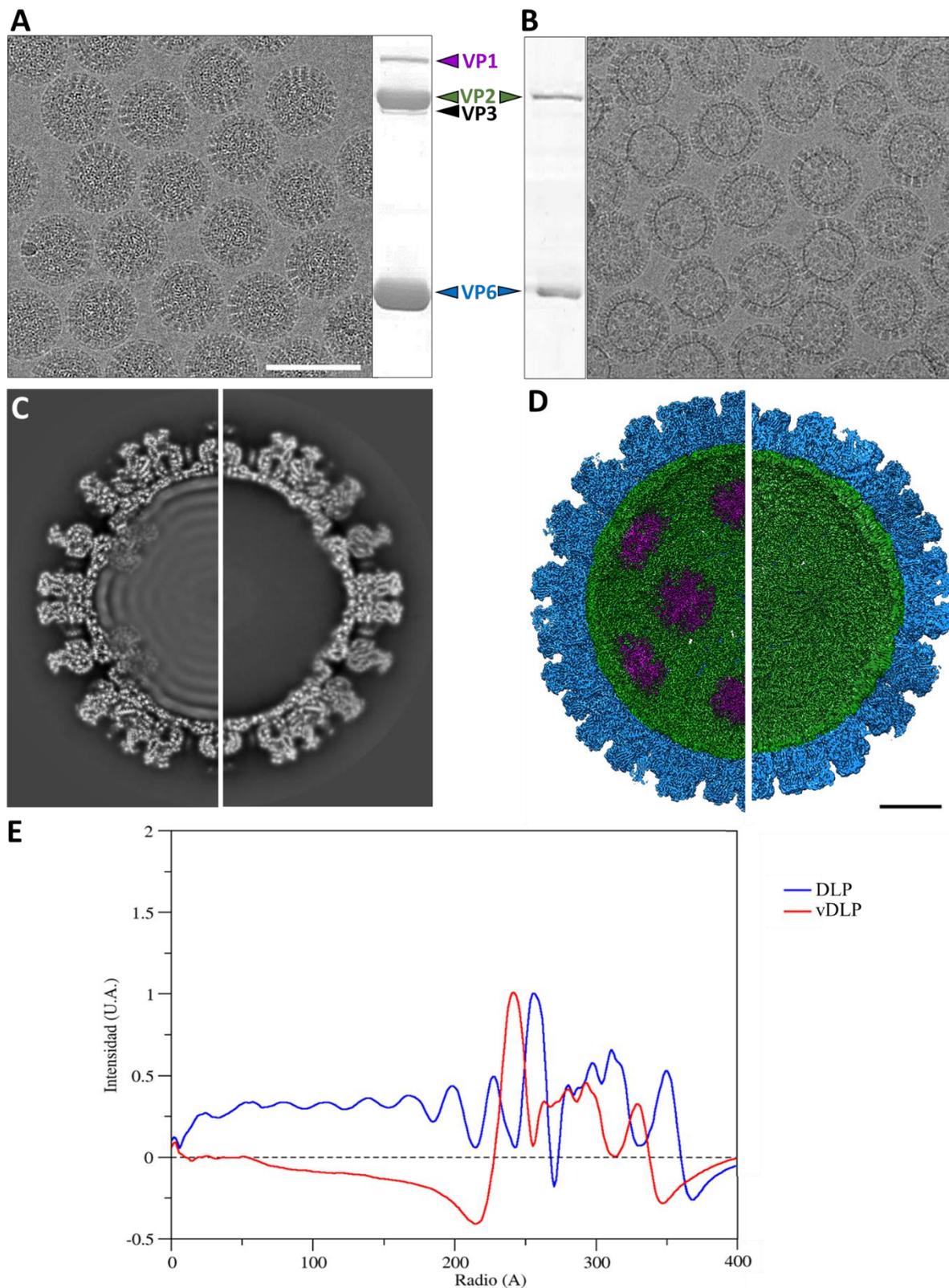
**Figura 23. Comparación de la expresión de VP2 y VP6 en células H5 utilizando diferentes multiplicidades de infección.** Análisis bioquímico mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de los extractos celulares de células H5 infectadas con rBV-VP2/VP6 y recogidas a 144 hpi. Cada carril muestra la diferente multiplicidad de infección utilizada en cada caso: 0.3, 0.5, 0.6 (A), 0.6, 1, 2.5, 4 (B). Se indican las posiciones de las proteínas estructurales (VP) de RV.

#### 4.2.2. Preparación y análisis de la DLP de SA11

Una vez preparadas las vDLP pasamos a la preparación de DLP para poder comparar la estructura atómica de ambas y determinar si las vDLP obtenidas mediante el BEVS son un fiel modelo de la DLP natural.

Las DLP, obtenidas a partir de cultivos de células MA104 infectadas en presencia de tripsina con el RVA de la estirpe SA11 (Rodríguez et al., 2014), se prepararon como se detalla en el protocolo del apartado 2.3.2, a partir de partículas TLP tratadas con EDTA. Este agente quelante promueve el desensamblaje de los trímeros de VP7 estabilizados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Cohen et al., 1979; P. R. Dormitzer et al., 2000). Las DLP se aislaron en un gradiente de  $\text{CsCl}_2$  realizado en presencia de EDTA y se analizaron bioquímicamente (Fig. 24A). La visualización directa de estas partículas tanto por tinción negativa como en imágenes de criome muestra una gran homogeneidad e integridad estructural (Fig. 24A).

En paralelo se analizaron las muestras correspondientes a las vDLP que fueron vitrificadas y analizadas mediante criome (Fig. 24B). La visualización directa de las vDLP de RVA en imágenes de criome muestra poblaciones homogéneas de partículas isométricas de aproximadamente 70 nm de diámetro y morfología circular, similares las DLP generadas durante una infección natural (Fig. 24B) pero sin la presencia del material electrodensito en su interior (Fig. 24A). Se registraron 6.329 y 4480 películas de criome correspondientes a DLP y vDLP, respectivamente, de las que se seleccionaron 91727 y 84926 partículas, en cada caso, para su procesamiento digital mediante análisis de partículas individuales (SPA). Las partículas fueron analizadas mediante clasificación 2D, 3D y posterior refinamiento angular iterativo para la obtención de su 3DR. Se generaron mapas de densidad con una resolución final de 3,04 Å y 3.42 Å para DLP y vDLP de RVA, respectivamente, en base a los criterios de FSC 0.143 (Fig. 24C-D, anexo 4).



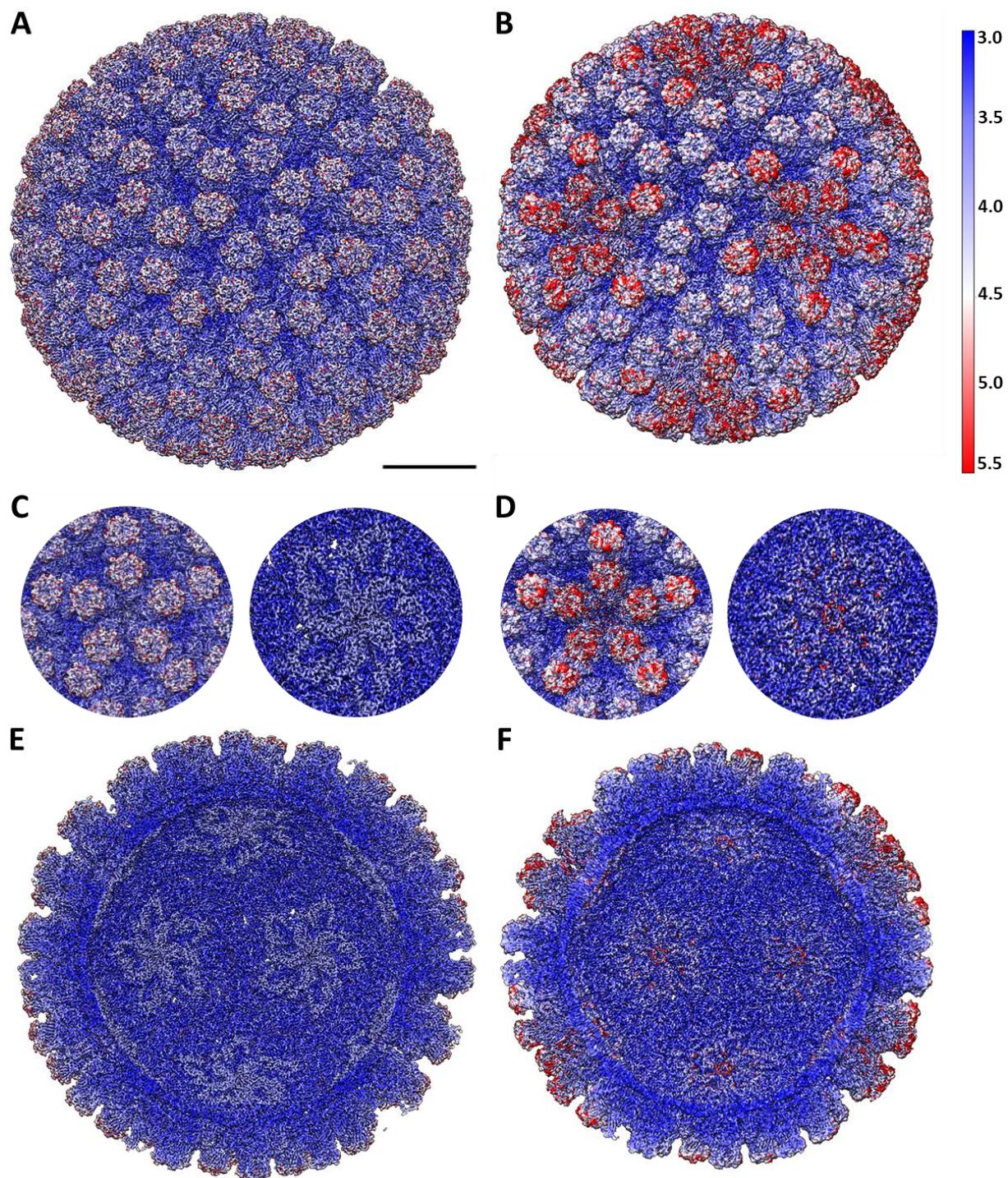
**Figura 24. Reconstrucción tridimensional de la vDLP y comparación con la DLP.** (A-B) Análisis bioquímico mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de DLP (A) y vDLP de RVA (B). Se indican las posiciones de las proteínas estructurales (VP) de RV. Se muestran criomicrografías electrónicas para ambas. La barra de escala corresponde a 100 nm. (C) Sección central del mapa de densidad de DLP (panel izquierdo) y vDLP (panel derecho) vista a lo largo del eje de simetría de orden dos. (D) Sección central de la estructura tridimensional de la DLP (panel izquierdo) y vDLP (panel derecho), vista a lo largo del eje de simetría de orden dos, representadas radialmente mediante el siguiente código de colores: VP6 en azul, VP2 en verde y VP1 en morado. Las densidades se contornean a  $2\sigma$  por encima de la media. La barra de escala corresponde a 100 nm. (E) Representación de los perfiles radiales de las partículas DLP (azul) y vDLP (rojo).

Ambas 3DR muestran una estructura similar a la previamente descrita para la partícula DLP de la estirpe RRV de RVA (McClain et al., 2010) (J. Z. Chen et al., 2009), con dos capas definidas de VP6 y VP2 que presentan numerosas conexiones entre ellas. La capa externa de VP6 con simetría T=13 se localiza sobre la capa de VP2 subyacente que presenta una arquitectura T=1.

En el caso de la DLP, se observa la presencia del complejo de replicación en las posiciones pentaméricas de la cara interna de la cápsida de VP2 y hasta 7 capas concéntricas de dsRNA con una separación promedio de 42 Å (Fig. 24C-D). De forma previsible, no encontramos presencia del genoma viral ni de la polimerasa en el interior de las vDLP (Fig. 24D). Además, la comparación de los mapas de densidad de ambas partículas y de sus promediados radiales (Fig. 24E) muestra una expansión de 45 Å en el diámetro de las DLP (37 nm de diámetro) con respecto a las vDLP. Este incremento podría estar relacionado con la presencia del genoma y el complejo de replicación/transcripción en el interior de las DLP.

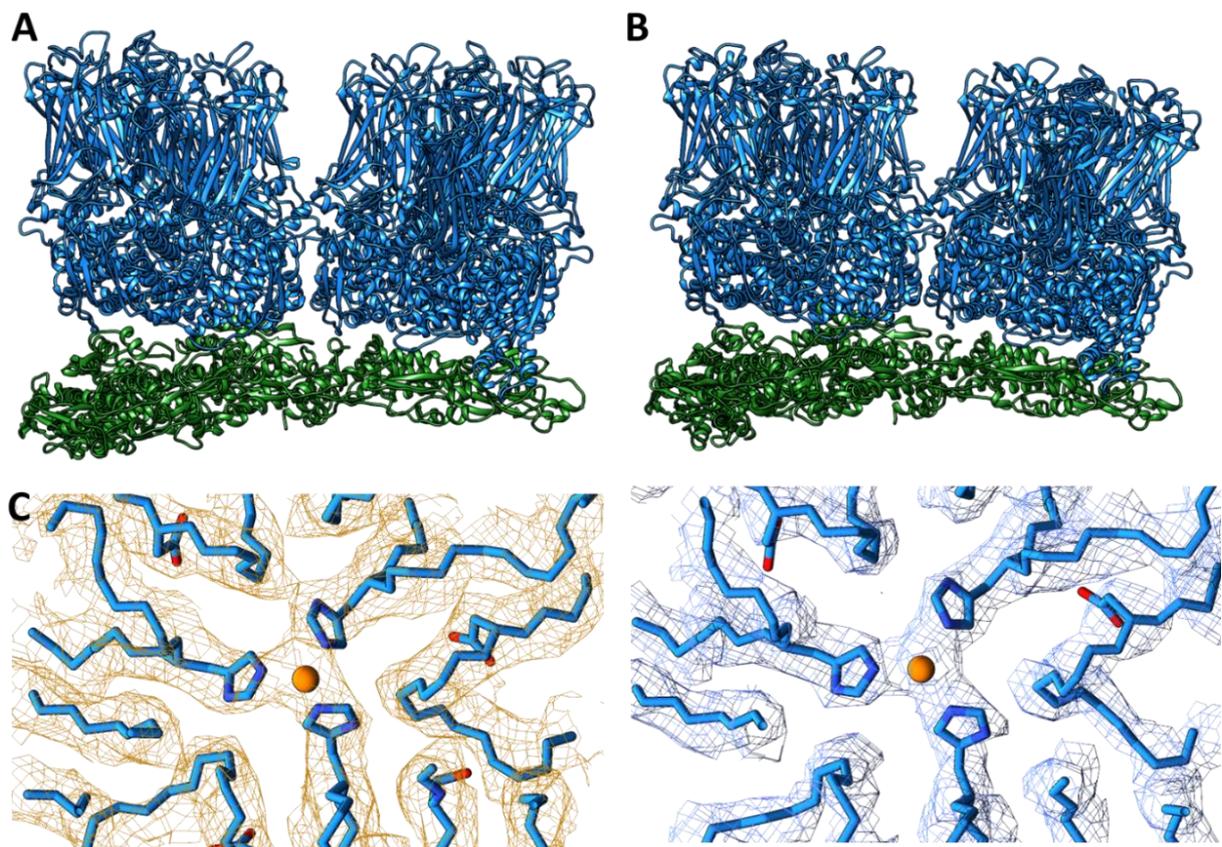
El análisis de la resolución local del mapa de densidad de la DLP y vDLP muestra una resolución global isotrópica de unos 3-4 Å (Fig. 25A, C). Sin embargo, encontramos en la vDLP una resolución local significativamente menor en los trímeros VP6 pentaméricos (P) y peripentaméricos (P') (Fig. 25B, D). Esta menor resolución se asocia a la menor densidad electrónica encontrada en el mapa en los trímeros P y P', siendo un 37.5% menor respecto al resto de trímeros VP6 y a la capa de VP2 subyacente. La resolución local es menor en las posiciones pentaméricas de la superficie interna de la cápsida de la vDLP que en sus equivalentes en la DLP (Fig. 25E, F). Esta pérdida de densidad podría estar asociada a la ausencia de la proteína VP1, situada en las regiones peripentaméricas en la DLP (Estrozi et al., 2013; S. C. Harrison & Dormitzer, 2016; Jenni et al., 2019).

Dado que la resolución obtenida para la DLP fue mayor y más homogénea, se realizó en primer lugar el trazado de la estructura atómica de las capas de VP6 y VP2 de la DLP utilizando como coordenadas de referencia las obtenidas a partir del mapa de criome de la NTR-TLP (apartado 4.1.3) (Fig. 26A). Tras un primer ajuste inicial de cuerpo rígido de la estructura atómica de la TLP sobre el mapa de densidad de la DLP, las coordenadas fueron revisadas manualmente, refinadas y validadas (tabla 2). Se observaron ligeras diferencias en el grado de interacción entre los diferentes trímeros de VP6 y la capa subyacente de VP2 (McClain et al., 2010). El trímero T de VP6 es el que mantiene una interacción más estrecha con VP2 a través de tres contactos idénticos mediados por el bucle  $\beta 2-\alpha 3$  (residuos 64-72) de VP6. Los trímeros T', D y P' interaccionan con VP2 con un menor número de contactos y el trímero P sólo se encuentra unido a la estructura de la cápsida por contactos intertriméricos VP6-VP6. La baja interacción de los trímeros P con la capa subyacente de VP2 podría estar relacionada con la pérdida de estos trímeros durante la purificación de las partículas y la consecuente menor resolución alcanzada en estas regiones en el mapa de la vDLP.



**Figura 25. Análisis de la resolución local de los mapas 3D obtenidos de la DLP y la vDLP.** (A) Representación de los mapas 3D de la partícula vDLP (panel derecho) y DLP (panel izquierdo) vistas a lo largo del eje icosaédrico de simetría 2. Las superficies están coloreadas de acuerdo con la resolución local calculada para cada 3DR. Se muestra el código de color con las correspondientes resoluciones en Å. La densidad se contornea a  $2\sigma$  por encima de la media. La barra de escala representa 100 Å. (B) Sección central de los mapas de densidad representados en el panel A para la DLP (panel izquierdo) y la vDLP (panel derecho) vista a lo largo del eje de simetría de orden dos. (C) Detalles de las regiones pentaméricas de la cara externa e interna de ambos mapas, vDLP (paneles izquierdos) y DLP (paneles derechos).

Además del trazado de las cadenas VP2 y VP6, se observaron densidades correspondientes a las posiciones donde coordina un ion zinc ( $Zn^{+}$ ) con la H153 de cada monómero que forma el trímero de VP6 (Fig. 26C, panel izquierdo) (Mathieu et al., 2001; Saugar et al., 2005). El modelo generado fue utilizado como modelo inicial para el trazado de las coordenadas de la vDLP mediante la misma estrategia: ajuste considerando cada cadena como un cuerpo rígido, ajuste manual sobre el mapa de densidad y refinamiento de las coordenadas en espacio real (Fig. 26B, tabla 2). La menor resolución de los trímeros P y P' en la vDLP sólo permitió modelar la cadena de carbonos  $\alpha$  a partir del modelo atómico de referencia sin poder llevar a cabo el ajuste de las cadenas laterales. En este caso, se pudieron visualizar densidades ubicadas entre los monómeros que forman el trímero de VP6 correspondientes a posiciones que se encuentran coordinando un ion  $Zn^{+}$  sólo en los trímeros T, T' y D (Fig. 26C, panel derecho).



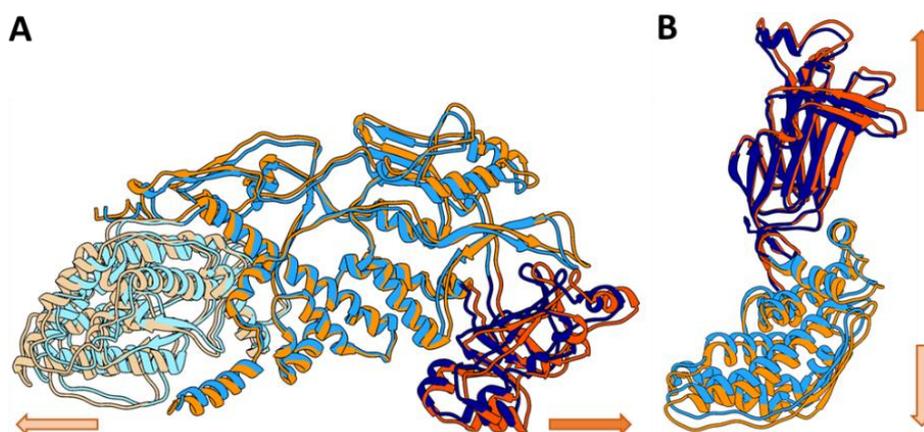
**Figura 26. Análisis de las estructuras atómicas de la DLP y vDLP de RVA.** (A-B) Estructura atómica de la subunidad asimétrica de DLP (A) y vDLP (B) de RVA. Las cadenas de VP2 están representadas en verde oscuro y las de VP6 en azul. (C). Secciones del mapa de densidad de la DLP (panel izquierdo) y vDLP (panel derecho) con su estructura atómica ajustada. Se muestra un corte transversal del trímero T de VP6 en el que se observa una densidad central coincidente con el ion  $Zn^{+}$  coordinado por histidinas (153H) de cada una de las cadenas que forman el trímero. En todos los paneles se representan algunas cadenas laterales como indicadores de la resolución alcanzada en los mapas.

La estructura atómica observada de las subunidades asimétricas de la DLP y la vDLP es similar. Ambas están formadas por 2 subunidades de VP2 y 13 subunidades de VP6, sin embargo, se puede observar una expansión ortogonal de  $\sim 15$  Å en la DLP (Fig. 27) con respecto a la vDLP. Esta expansión se corresponde con la previamente observada en el análisis de los perfiles radiales de las 3DRs de ambas partículas (Fig. 24E).

Al solapar los monómeros de VP2 por el dominio central se puede ver cómo esta expansión se produce hacia ambos extremos del monómero, es decir, hacia los dominios apical y dimérico (Fig. 27A). Al solapar los monómeros de VP6 por su región central, se observa, al igual que en VP2, una expansión hacia el dominio  $\alpha$ -hélice basal y el dominio barril- $\beta$  apical (Fig. 27B). Probablemente, tanto la ausencia de genoma como del complejo de replicación en el interior de las vDLP sean las causantes de las diferencias observadas en el plegamiento de los diferentes dominios y variaciones en el tamaño de la cápsida con respecto a la estructura encontrada en la DLP resultante de una infección natural.

Ambos monómeros, VP2 y VP6, fueron alineados estructuralmente y analizados mediante el servidor Dali (Holm et al., 2006; Holm & Rosenström, 2010). Los parámetros de los alineamientos se resumen en la tabla 4. El análisis de la desviación cuadrática media (rmsd), entre los residuos de los monómeros completos, VP2 (A-B) y VP6 (C-O), es considerablemente mayor en comparación a los valores obtenidos cuando se realiza el análisis por dominios (tabla 4).

Esto refleja una mayor similitud estructural a nivel de dominios de forma separada y cómo los cambios estructurales observados están asociados a diferencias en los bucles que conectan los distintos dominios de VP2 y VP6 y que se traducen en la expansión de la DLP con respecto a la vDLP.



**Figura 27. Representación de la expansión producida entre la estructura de la DLP y vDLP.** Representación de las estructuras atómicas de los monómeros de VP2 (A) y VP6 (B) de la DLP y vDLP de RVA alineados entre sí. Se observa el dominio central de VP2 de DLP (naranja) solapado al mismo dominio de la vDLP (azul) y la expansión, indicada con flechas, de los dominios apical (naranja claro) y dimérico (naranja oscuro) de VP2 de la DLP. Las cadenas VP6 de ambas estructuras se alinean en su región central y se observa la expansión hacia el dominio basal  $\alpha$ -hélice (naranja) y el dominio barril- $\beta$  de VP6 (naranja oscuro), indicado con flechas.

	Proteínas	rmsd (Å)	z-score	C $\alpha$ alineados
VP6	Monómero	1.6	44.6	397
	Dominio $\beta$ -Barril	1	27	194
	Dominio $\alpha$ -Hélice	1	28.5	203
VP2	Monómero	2.3	35.7	779
	Dominio Apical	1.3	38.3	287
	Dominio Central	1.6	36.6	381
	Dominio Dimérico	1.8	22.1	134

Tabla 4. Alineamiento estructural de las estructuras de la DLP y vDLP con Dali

### 4.3. Expresión y caracterización de partículas vDLP de los distintos grupos de RV

Una vez comprobada la validez del sistema BEVS para generar vDLP de RVA estructuralmente semejantes a la DLP natural, se procedió a la generación de vDLP del resto de grupos de RV (B-D F-I) utilizando la misma estrategia.

#### 4.3.1. Generación, caracterización bioquímica y análisis por microscopía electrónica

Para ello se generaron rBV duales que expresan de forma simultánea las proteínas VP2 y VP6 de las estirpes modelo de los diferentes grupos de RV (B-D y F-I) y se realizaron infecciones en células H5 utilizando los parámetros establecidos para RVA. Las células se infectaron e incubaron a 27°C hasta alcanzar 144 hpi. Posteriormente, se recogieron los extractos celulares y los sobrenadantes de infección; estos sobrenadantes se purificaron mediante un colchón de sacarosa al 25%.

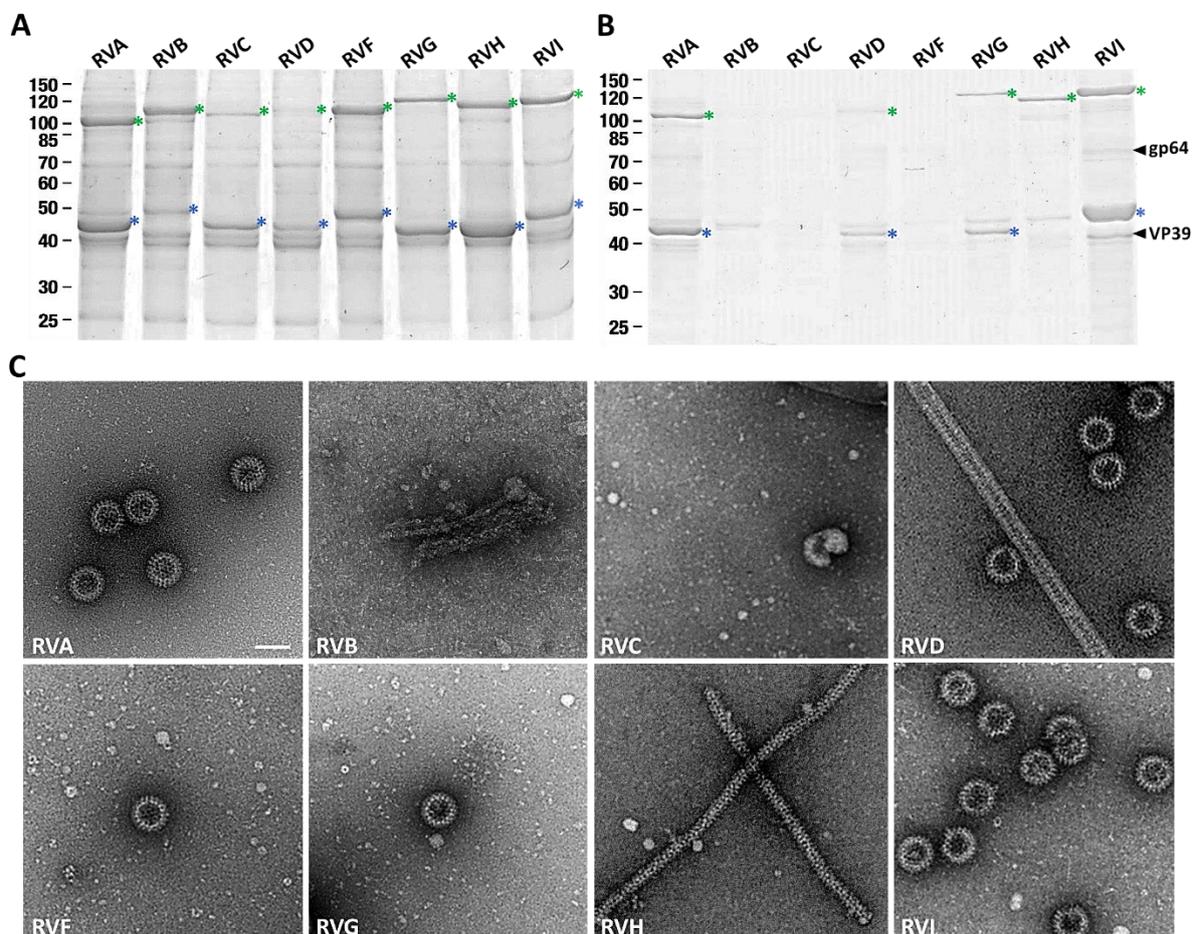
El análisis mediante SDS-PAGE de las células infectadas permitió detectar una clara expresión de las proteínas estructurales VP2 y VP6 para todos los grupos (Fig. 28A, tabla 5), aunque en el caso de RVB se detectaron niveles más bajos de expresión de VP6, en RVC de VP2 y en el caso de RVD una baja expresión de ambas proteínas, en comparación a los demás grupos.

Grupos rotavirus	Peso molecular (kDa)			
	VP2		VP6	
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
A	103.01	120.40	44.8	43.66
B	105.90	107.11	43.58	51.04
C	101.67	103.01	44.72	43.67
D	106.21	103.01	44.91	43.67
F	104.45	107.11	44.71	57.38
G	112.66	115.80	43.40	42.00
H	111.05	111.37	42.92	42.00
I	110.60	115.80	42.59	57.38

Tabla 5. Pesos moleculares de las diferentes proteínas VP2 y VP6 expresadas de los diferentes grupos de RV.

Con el objetivo de aislar posibles ensamblados macromoleculares de los sobrenadantes de las infecciones, estos fueron ultracentrifugados a través de un colchón de sacarosa al 25%. El análisis bioquímico de los precipitados obtenidos muestra la presencia de material particulado formado por VP2

y VP6 en los grupos A, D, G, e I (Fig. 28B). La abundancia relativa de material particulado en RVD, RVG y RVI, podría indicar un mejor ensamblaje de las vDLPs bajo estas condiciones de expresión, óptimas para RVA, o bien una mayor estabilidad de los ensamblados formados. Para los grupos B, C y F, no se observa la presencia de las bandas correspondientes a las proteínas, mientras que en el caso del RVH únicamente se detecta la presencia de VP2, lo que sería compatible con la formación de SLP o agregados de VP2 (Fig. 28B). Además, se observaron dos bandas con pesos moleculares similares a dos proteínas estructurales mayoritarias de baculovirus (gp64 y VP39). La naturaleza de los posibles ensamblados se caracterizó mediante microscopía electrónica por tinción negativa (Fig. 28C). Se observaron vDLP íntegramente ensambladas en los grupos A, D, F, G e I. La abundancia relativa de vDLP en las muestras se encuentra reflejada en la Tabla 6. Aunque en los grupos F y G se observan vDLP obtenidas del sobrenadante de infección, su número es mucho menor que en las muestras correspondientes a los grupos A, D e I.

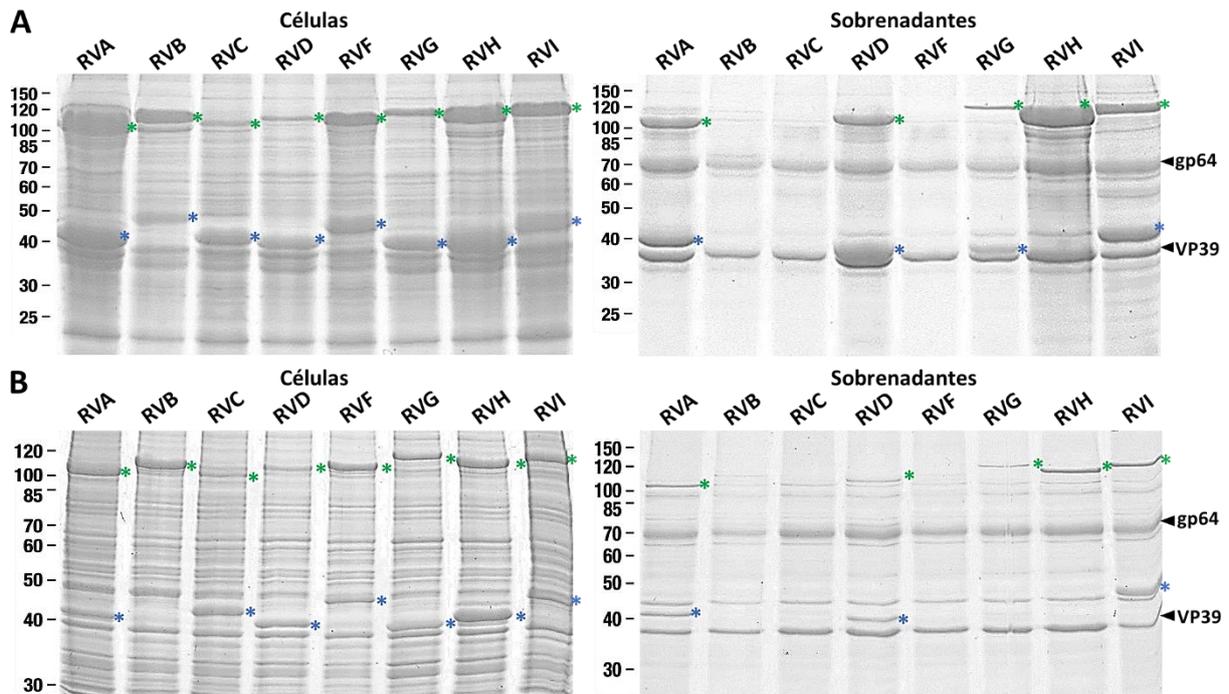


**Figura 28. Caracterización de la expresión de VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV en la línea celular H5.** (A-B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de extractos de células H5 infectadas (A) y del material particulado presente en los sobrenadantes de infecciones (B) con los rBVs que expresan las proteínas estructurales VP2 y VP6 de los distintos grupos de RV. Se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular, con asteriscos de color verde las posiciones de la proteína VP2 y de color azul las de la proteína VP6. Las flechas gp64 y VP39 indican la posición de las proteínas estructurales más abundantes de baculovirus. (C) Análisis por ME y tinción negativa del material particulado. Se indica el grupo de RV correspondiente a cada imagen. La barra de escala corresponde a 100 nm.

#### 4.3.2. Efecto de la línea celular en la formación de vDLP

La línea celular empleada es uno de los factores que tiene un efecto más importante en la expresión de proteínas en el sistema de BEVS (Drugmand et al., 2012), por lo que nos propusimos evaluar la producción de las proteínas recombinantes, su ensamblaje en vDLP y su liberación al medio extracelular empleando las líneas celulares de insecto Sf9 y Sf21, que junto con la línea H5, son las más empleadas en este sistema. Para ello, se realizaron los mismos análisis descritos en el apartado anterior.

El análisis bioquímico mediante SDS-PAGE de las células infectadas (Fig. 29A-B, células) mostró para ambas líneas el mismo patrón de expresión de las proteínas VP2 y VP6 y la misma relación de intensidades observada en las infecciones de células H5, aunque con un menor nivel de expresión, sobre todo en el caso de Sf21 (Fig. 29B, células). El análisis del material particulado contenido en el sobrenadante de infección y separado mediante colchones de sacarosa muestra la presencia de bandas correspondientes a las proteínas VP2 y VP6 así como numerosas bandas adicionales (Fig. 29A-B, sobrenadantes). La mayoría de estas bandas probablemente corresponden a proteínas estructurales de baculovirus, ya que estas líneas celulares, Sf9 y Sf21, producen hasta 15 veces más partículas infectivas de baculovirus que la línea celular H5 (Drugmand et al., 2012; Irons et al., 2018). Las bandas correspondientes a gp64 y VP39, las dos proteínas estructurales mayoritarias de baculovirus, son claramente identificables en los perfiles electroforéticos, especialmente en los del material particulado



**Figura 29. Caracterización de la expresión de VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV en las líneas celulares Sf9 (A) y Sf21 (B).** Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de extractos de células infectadas (Células) y del material particulado presente en los sobrenadantes de infecciones (Sobrenadantes) con los rBVs que expresan las proteínas estructurales VP2 y VP6 de los distintos grupos de RV. Se indican con asteriscos de color verde las posiciones de las bandas correspondientes a la proteína VP2 y de color azul en el caso de VP6. Las flechas gp64 y VP39 indican la posición de las proteínas estructurales más abundantes de baculovirus.

purificado de los sobrenadantes (Fig. 29A-B, sobrenadantes). La diferencia más importante observada con respecto a las expresiones en H5 es la presencia de una mayor cantidad de VP2 y VP6 en el material particulado correspondiente a RVD en la línea celular Sf9 (Fig. 29A, sobrenadantes RVD), lo que podría indicar una mayor eficiencia en el ensamblaje de vDLP en esta línea celular.

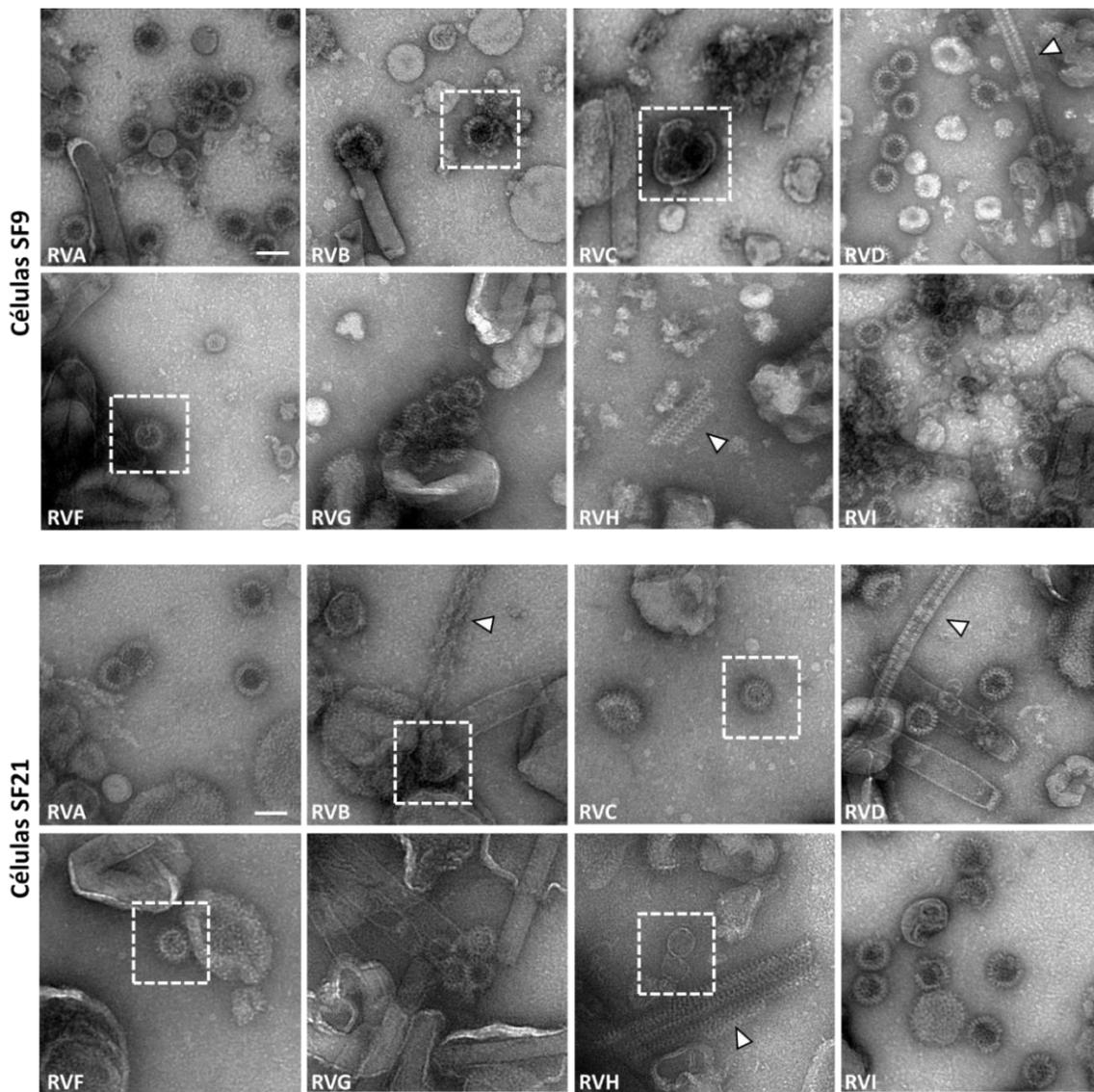
El análisis por tinción negativa de los sedimentos confirmó la mayor presencia de partículas de baculovirus y restos de celulares junto con los ensamblados derivados de la expresión de VP2 y/o VP6 en todas las muestras obtenidas de estas dos líneas celulares. En el caso de Sf9 la cantidad relativa de partículas obtenidas fue muy similar a la obtenida en H5, mientras que la integridad estructural de las mismas parece menor. Las vDLP de RVA, D, F, G, y I se encontraron en muchos casos parcialmente ensambladas y asociadas entre sí, a membranas o a impurezas presentes en la muestra (Fig. 30). De acuerdo con lo observado en los análisis bioquímicos, la cantidad de vDLP de RVD es mucho mayor que en las preparaciones obtenidas en la línea celular H5 (Fig. 30).

A diferencia de lo observado en la línea H5, fue posible la visualización de vDLP de RVB y RVC, aunque parcialmente ensambladas, rotas y asociadas a membranas obtenidas en la línea celular Sf9 y Sf21. En el caso de RVH, se observaron estructuras tubulares, en ambas líneas celulares, semejantes a las descritas en la línea celular H5 (Fig. 30). Tras estos resultados, se descartó la línea celular Sf21 para la generación de vDLP ya que, aunque se observó la formación de partículas vDLP de RVA, D, G, F e I, la integridad estructural encontradas en las mismas fue bastante deficiente y la cantidad purificada fue menor a la encontrada en la línea celular Sf9.

Los resultados mostrados en los apartados anteriores indican que la cantidad de vDLP aisladas de los sobrenadantes de las infecciones con los rBV de RVI en células H5 y de RVD en células Sf9 es igual o superior a la producida para RVA, suficiente, por tanto, como para abordar su purificación a mayor escala. También hemos determinado que los niveles de expresión de las proteínas VP2 y VP6 de las especies RVB, RVC, RVF, RVG y RVH, son superiores en la mayoría de los casos a los observados para RVD, y sin embargo apenas se pueden aislar vDLP de los sobrenadantes de estas infecciones. Para determinar si esto se debe a un problema en el ensamblaje de las vDLP, o en la liberación de estas al sobrenadante del medio de cultivo se realizó un análisis ultraestructural de células H5 y Sf9 infectadas con los diferentes rBV.

#### **4.3.3. Análisis ultraestructural de la formación de partículas vDLP**

Con el objetivo de analizar el posible ensamblaje las partículas en el interior de estas células se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión cortes ultrafinos de células H5 y Sf9 infectadas con los distintos baculovirus e incluidas en resina epoxídica. En paralelo se analizaron inclusiones de células de insecto no infectadas o infectadas con el baculovirus control. Las inclusiones



**Figura 30. Análisis por microscopía electrónica y tinción negativa del material particulado obtenido de los sobrenadantes de infección de los diferentes grupos de RV en las líneas celulares SF9 y Sf21.** Se indica el grupo de RV correspondiente a cada imagen. Se indica mediante recuadros discontinuos aquellas partículas vDLP no claramente visibles para RVB, RVC, RVF y RVH. Las flechas blancas indican estructuras tubulares semejantes a tubos de VP6. La barra de escala corresponde a 100 nm.

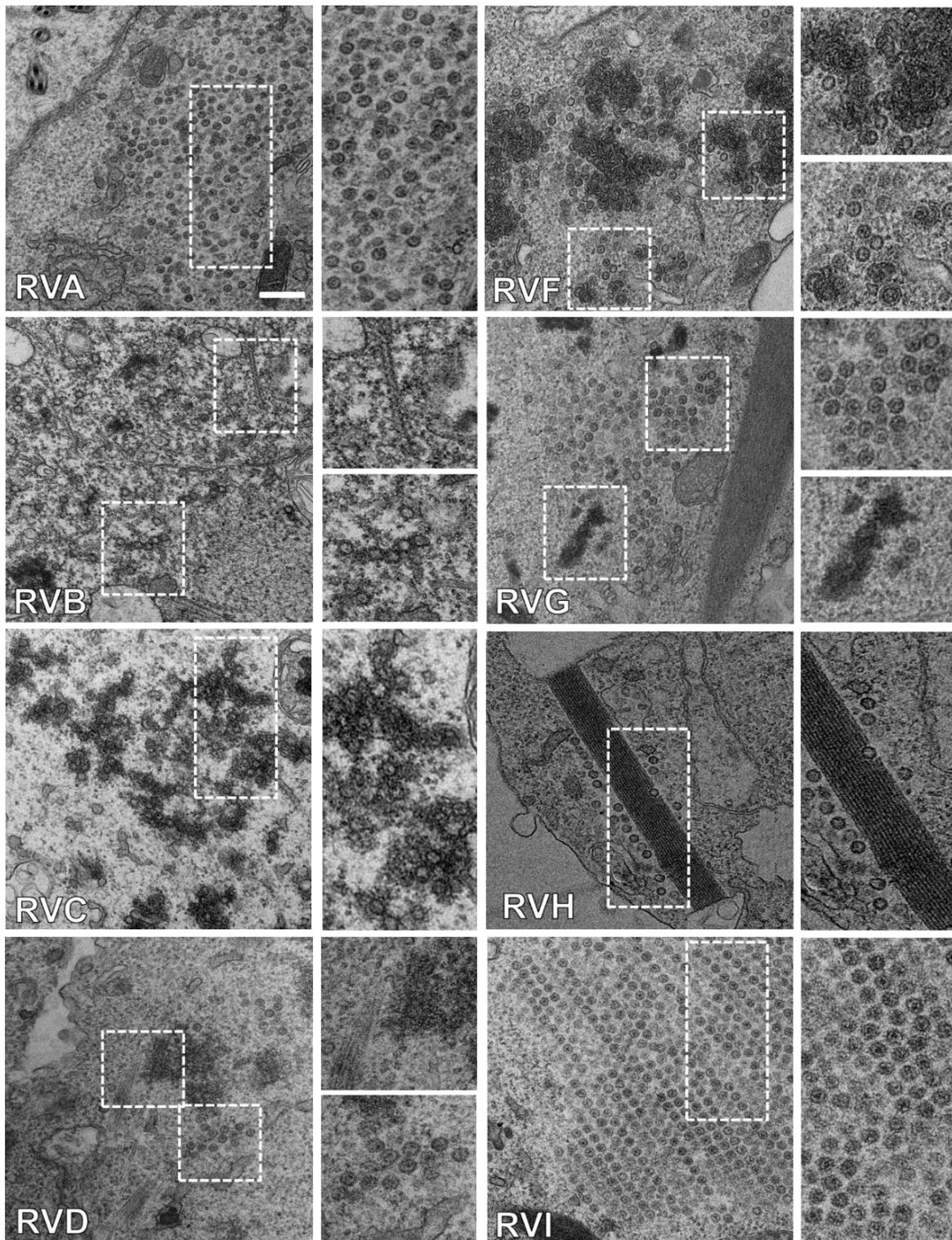
se realizaron a las 72 hpi, un tiempo que nos proporciona un compromiso entre la progresión de la infección y la preservación ultraestructural.

Durante una infección natural, VP2 y VP6 son reclutadas a los viroplasmos formados por NSP2 y NSP5 (Fabbretti et al., 1999). En el modelo actual de morfogénesis del RVA (Desselberger et al., 2009; Hiroshi Suzuki, 2019), el ensamblaje de las DLPs se produce en la periferia de los viroplasmos donde hay una elevada concentración local de VP6 (Berois et al., 2003; Desselberger, 2014). Las DLP formadas permanecerían en el viroplasma desarrollando la transcripción secundaria (Ayala-Breton et al., 2009) o, mediante su interacción con NSP4 y VP4, se internarían en el retículo endoplásmico, que rodea los viroplasmos, para proseguir la ruta morfogénica y generar TLP (M. K. Estes & Greenberg,

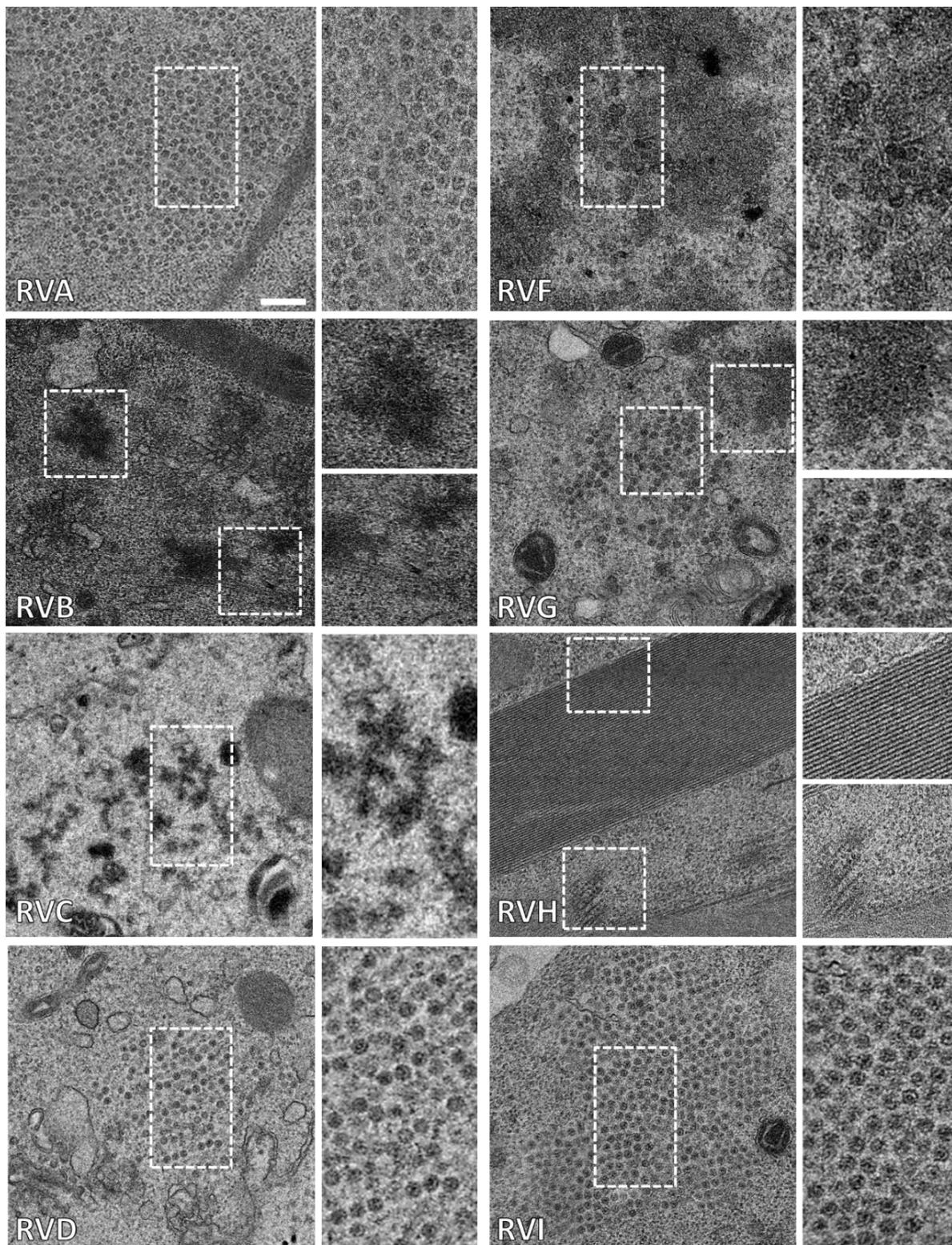
2013; T. López et al., 2005; O'Brien et al., 2000). A pesar de la ausencia de las proteínas no estructurales y por lo tanto, de viroplasmos, la coexpresión de VP2 y VP6 da lugar al ensamblaje de DLP (Zeng et al., 1996b), y su coexpresión con VP7 y VP4 produce TLP aunque con una baja eficacia (S E Crawford et al., 1994).

Los resultados obtenidos del análisis de los cortes ultrafinos de las infecciones de los rBV de RVA en células H5 y Sf9 son similares a los descritos para la localización y formación de vDLP de RVA ensambladas en células Sf9 (Berois et al., 2003; Mena et al., 2006). Se observa la presencia de estructuras esféricas que evocan vDLP ensambladas de unos 50-60 nm de diámetro en el citoplasma de las células infectadas tanto en H5 (Fig. 31, RVA) como en Sf9 (Fig. 32, RVA). La ultraestructura de las células infectadas presentaba ciertas características no observadas en células sin infectar (Mock). En células infectadas es posible ver la presencia de baculovirus en el interior del núcleo celular, así como la aparición de grandes zonas electrodensas en el citoplasma, un aumento del número de vesículas y estructuras membranosas amorfas agrupadas en el citoplasma. En algunas células se observaron estructuras esféricas similares a vDLP sin una localización específica en el citoplasma. Las partículas se encuentran en regiones perinucleares, cerca de estructuras membranosas, electrodensas, o distribuidas en otras regiones del citoplasma sin una asociación aparente a ningún elemento celular.

Los datos muestran que existe una buena correlación entre la presencia de las DLP en los sobrenadantes de infección y su observación en el interior celular. Esto indica que el problema referente a la ausencia de formación de vDLP en los grupos RVB, C, F, G y H radicaría en el ensamblaje de las partículas en estas condiciones de expresión y no en la incapacidad de purificarlas. Así, en el caso de RVA y RVI se observó un gran número de vDLP en ambas líneas celulares H5 (Fig. 31; RVA, RVI) y Sf9 (Fig. 32; RVA, RVI), formando incluso paracrístales no rodeados de membrana en RVI en ambas líneas celulares. En el caso de RVD se identifica con facilidad la presencia de vDLP, aunque en menor cantidad que en RVI o RVA, y además el ensamblaje parece ser más eficaz en Sf9 (Fig. 32; RVD) que en H5 (Fig. 31; RVD), en concordancia con los resultados obtenidos previamente. El ensamblaje de las vDLP ocurre con menor frecuencia en RVG y todavía menos en RVF, aunque es posible identificar zonas en las que aparecen grupos de vDLP que muestran una aparente integridad estructural (Fig. 31, 32; RVF, RVG). En el caso de RVH destaca la presencia de grandes ensamblados de estructura aparentemente tubular adyacentes a alguna vDLP en el caso de H5 (Fig. 31; RVH), y de lo que parecen ser SLP cuando las infecciones se analizan en células Sf9 (Fig. 32; RVH). En células que expresan las proteínas de RVB y RVC se observaron estructuras filamentosas, agregados intracelulares y, muy ocasionalmente, material particulado que podría corresponder a vDLP pero sin la misma integridad estructural vista en los otros grupos (Fig. 31, 32; RVB, RVC). Ninguna de estas estructuras (vDLP, tubos o agregados intracelulares) fueron detectadas en las células sin infectar (Mock), ni en células infectadas con un rBV control.



**Figura 31. Caracterización ultraestructural de células H5 infectadas con rBVs para la coexpresión de las proteínas VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV.** Microscopía electrónica de secciones ultrafinas de células H5 infectadas incluidas en resina epoxídica. Cada panel viene indicado con la letra correspondiente al grupo de RV estudiado. Los paneles de la izquierda muestran una visión global y representativa de lo observado en las secciones. Se recuadran las regiones de interés ampliadas a la derecha de cada panel. En cada caso se observó: (RVA) paracristales de partículas ensambladas, (RVB) partículas asociadas a inclusiones intracelulares y estructuras tubulares, (RVC) partículas asociadas a inclusiones intracelulares, (RVD) partículas ensambladas, estructuras tubulares e inclusiones intracelulares, (RVF) partículas ensambladas y partículas asociadas a inclusiones intracelulares, (RVG) partículas ensambladas y partículas asociadas a inclusiones intracelulares, (RVH) partículas ensambladas junto a estructuras tubulares y (RVI) paracristales de partículas ensambladas. La barra de escala corresponde a 500 nm.



**Figura 32. Caracterización ultraestructural de células SF9 infectadas con rBVs para la coexpresión de las proteínas VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV.** Microscopía electrónica de secciones ultrafinas de células SF9 infectadas incluidas en resina epoxídica. Cada panel viene indicado con la letra correspondiente al grupo de RV estudiado. Los paneles de la izquierda muestran una visión global y representativa de lo observado en las secciones. Se recuadran las regiones de interés ampliadas a la derecha de cada panel. En cada caso se observó: (RVA) paracristales de partículas ensambladas, (RVB) inclusiones intracelulares y estructuras tubulares, (RVC) inclusiones intracelulares, (RVD) partículas ensambladas, (RVF) partículas asociadas a inclusiones intracelulares, (G) partículas ensambladas y partículas asociadas a inclusiones intracelulares, (RVH) partículas ensambladas junto a estructuras tubulares y (RVI) paracristales de partículas ensambladas. La barra de escala corresponde a 500 nm.

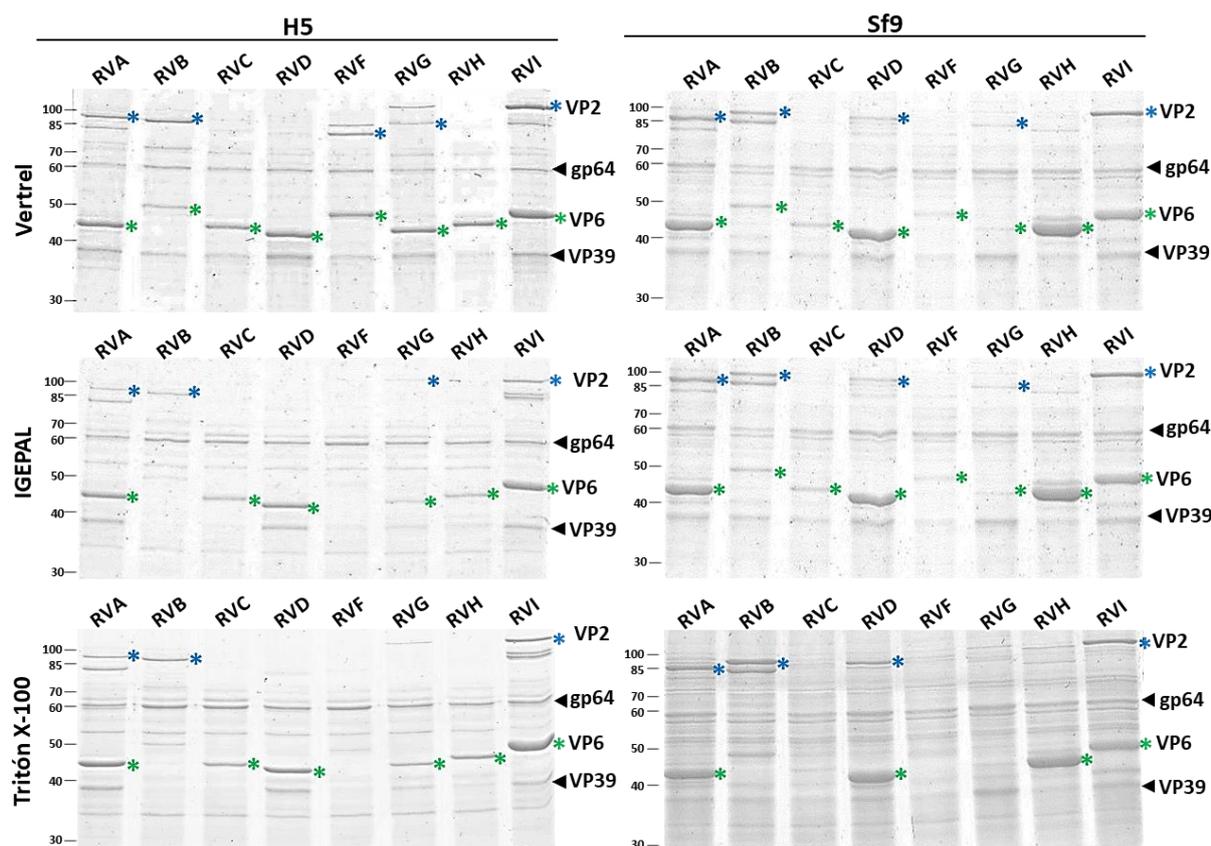
#### 4.4. Purificación de vDLP de extractos de células infectadas

Los resultados anteriores indican que únicamente se libera al medio extracelular una pequeña fracción de las vDLP producidas durante la infección y que en muchos casos estas aparecen asociadas a estructuras de membrana. Hipotetizamos que la solubilización de esas membranas permitiría la liberación de una mayor cantidad de vDLP. Con este objetivo, se decidió tratar células infectadas con rBVs para la coexpresión de las proteínas VP2 y VP6 de los diferentes grupos de RV con detergentes (IGEPAL CA-630 y Tritón X-100) y con el disolvente Vertrel XF (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluoropentano).

Se infectaron células H5 y Sf9 con los diferentes rBV y a las 144 hpi se recogieron las células y los sobrenadantes de infección. A continuación, las células fueron lavadas con PBS, sonicadas e incubadas con los detergentes o con Vertrel XF según el protocolo descrito en el apartado 3.3.4. Tras el tratamiento con los diferentes agentes, las muestras se centrifugaron para separar las fracciones solubles y éstas se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 33, anexo 5).

El análisis bioquímico (Fig. 33) de estas fracciones mostró que el tratamiento con los diferentes agentes es eficaz en la solubilización de una fracción adicional de proteínas VP2 y VP6 del interior de las células. En los casos en los que la producción de vDLP es más abundante, como RVA, RVD y RVI, los métodos empleados mostraron una eficacia mayor en la solubilización de VP2 y VP6. Para las células infectadas con RVB y RVF estos métodos permiten la solubilización simultánea de VP2 y VP6, no observada en los sobrenadantes de infección. En otros casos, la solubilización depende de la línea celular y del agente empleado. Así, la VP6 de RVC se observa mejor en las extracciones realizadas a partir de células H5, mientras que en el caso de RVD o RVH se detecta una mayor cantidad de VP2 y VP6 en células Sf9. Es interesante destacar la solubilización de elevadas cantidades de la proteína VP6 de RVH, sobre todo en células Sf9. Esta proteína no se detecta en los sobrenadantes de infección, ya probablemente debido a la formación de tubos, los cuales fueron observados en los cortes ultrafinos de estas células. Se observa también, una aparente degradación de la proteína VP2 en varios aislados durante este proceso de extracción. Esto puede estar debido a la rotura de los compartimentos subcelulares y la consiguiente liberación de enzimas proteolíticas. Esto es particularmente visible en el caso de la VP2 de RVB en células Sf9, y parece ser más acusado en las extracciones de células H5 infectadas, con los rBV correspondientes a RVA, RVB, RVF y RVI (Fig. 33).

Mientras que la extracción con Vertrel únicamente permite analizar la fracción solubilizada en la fase acuosa, en el caso de los tratamientos con los detergentes es posible analizar tanto la fracción soluble como la insoluble. El análisis comparativo de ambas fracciones de células tratadas con los detergentes Tritón X-100 e IGEPAL muestra que la mayoría de las proteínas VP2 y VP6 expresadas quedan retenidas en la fase insoluble (anexo 5).



**Figura 33. Análisis bioquímico de la fase soluble de extractos celulares tratados con detergentes y Vertrel.** Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fases solubles tras los tratamientos con detergentes o Vertrel XF de células H5 y Sf9 infectadas con los rBVs que expresan las proteínas estructurales VP2 y VP6 de los distintos grupos de RV indicados. Se indican con asteriscos de color verde las posiciones de las bandas correspondientes a la proteína VP2 y de color azul en el caso de VP6. Las flechas gp64 y VP39 indican la posición de las proteínas estructurales más abundantes de baculovirus.

Las fases solubles se analizaron mediante microscopía electrónica por tinción negativa para la línea celular H5 (anexo 6) y Sf9 (anexo 7), y sus imágenes representativas se presentan junto con un análisis similar de los sedimentos procedentes de sus sobrenadantes de infección ultracentrifugados a través un colchón de sacarosa al 25%, con el fin de comparar la cantidad e integridad de las partículas obtenidas por ambos métodos. La tabla 6 resume toda la información referente a la expresión de las proteínas VP2 y VP6 analizadas mediante SDS-PAGE, así como la presencia o ausencia de vDLP y tubos observados en las imágenes de tinción negativa por microscopía electrónica, que resumimos brevemente a continuación.

En el caso de RVA se obtiene una producción abundante de vDLP tanto intracelulares como en el sobrenadante de las infecciones. Se observaron vDLP purificadas del sobrenadante de infección en todas las líneas celulares, obteniéndose en mayor número y con una mayor integridad en la línea celular H5 (Fig. 34, RVA). Igualmente, se extrajeron partículas intracelulares de las líneas H5 y Sf9, pero en ningún caso con la misma integridad estructural observada en las partículas purificadas del medio extracelular.

Grupo	Línea Celular	Ensamblados purificados									
		Expresión celular		Sobrenadante		Intracelular					
		VP2	VP6	VLPs	Tubos	Tritón X-100		IGEPAL		Vertrel	
						VLPs	Tubos	VLPs	Tubos	VLPs	Tubos
RVA	H5	+++	+++	+++	-	+	-	+	-	++	-
	Sf9	+++	+++	+++	-	+	-	++	-	++	-
RVB	H5	+++	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	+
	Sf9	+++	+/-	+/-	-	+	+	+/-	+	+	+
RVC	H5	+	++	+/-	-	+/-	-	+	-	-	-
	Sf9	+	+++	+/-	-	+	-	+/-	-	-	-
RVD	H5	+/-	+	++	++	+	+	+	-	+	-
	Sf9	+	+++	+++	+	+	+	++	+	+	+
RVF	H5	+++	++	+	-	+	-	+	-	+	-
	Sf9	+++	+++	-	-	+	-	+	-	+	-
RVG	H5	++	++	++	-	++	-	+	-	++	-
	Sf9	++	+++	+	-	+	-	-	-	+/-	-
RVH	H5	++	+++	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	Sf9	+++	+++	-	+	+	-	+	-	-	-
RVI	H5	++	++	++++	-	+	-	+	+	+++	-
	Sf9	+++	+++	++++	-	+	-	+	-	++	-

**Tabla 6. Expresión de las proteínas VP2-VP6 y formación de vDLP a nivel intracelular y extracelular.** Se indica el grado de expresión intracelular de las proteínas VP2 y VP6 en las líneas celulares H5 y SF9 analizadas mediante SDS-PAGE (Expresión celular). Se utiliza una escala donde +++ es la máxima expresión y +/- es la mínima observada respecto a todo el conjunto de datos. Se indica el grado de vDLP o tubos purificados del medio extracelular del sobrenadante de la infección así como intracelulares tras la incubación de las células con Tritón X-100, IGEPAL o Vertrel. Se utiliza una escala donde ++++ es la máxima cantidad de ensamblados observados y - es la nula presencia de ensamblados observados respecto a todo el conjunto de datos.

La coexpresión de VP2 y VP6 de RVB no produce el ensamblaje de vDLP en cantidades significativas. Los sobrenadantes de infección ultracentrifugados de RVB contenían estructuras tubulares observadas en las líneas celulares H5, pero no se observaron vDLP en ninguna línea celular. El tratamiento con detergentes o Vertrel permitió visualizar las mismas estructuras tubulares en las fracciones solubles obtenidas en las dos líneas celulares (anexo 6 y 7). Únicamente en el caso de células H5 incubadas con Tritón X-100 e IGEPAL fue posible la observación de vDLP agregadas junto con restos de vesículas o tubos (Fig. 34, RVB).

En el caso de RVC tampoco se produce un ensamblaje eficiente de vDLP. Sólo se observaron partículas aisladas de RVC o fragmentos de ellas en los sobrenadantes de infección ultracentrifugados. La observación de las fases solubles en este caso permitió la visualización de algunas partículas agregadas y con baja integridad estructural. El mayor número de partículas se encontró en la fase soluble de células SF9 incubadas con Tritón X-100 (Fig. 34, RVC).

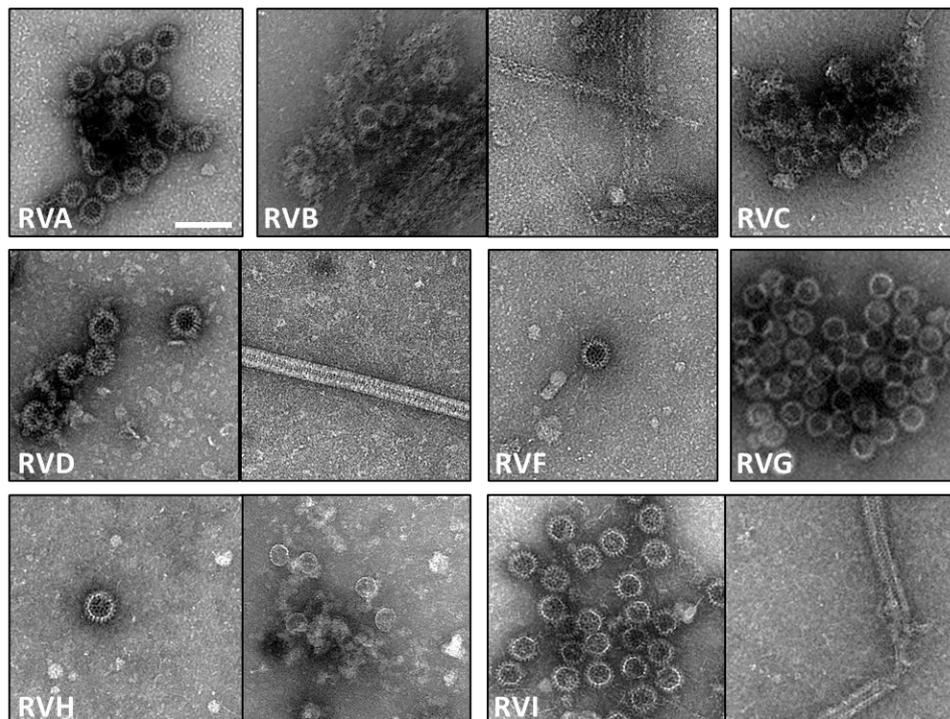
La coexpresión de VP2 y VP6 de RVD permite el ensamblaje, más eficiente en la línea celular Sf9, de vDLP que son liberadas al medio de cultivo. El análisis de los sobrenadantes de infección permitió además observar la presencia de estructuras tubulares, probablemente formadas por VP6 (Fig. 34, RVD). En ningún caso, el tratamiento con detergentes de las células infectadas permitió la extracción y observación de un mayor número de partículas que las purificadas del medio extracelular. La mayoría se observaron agregadas entre sí o unidas a vesículas. Igualmente, se pudieron observar tubos de VP6 extraídos del interior de células H5 y Sf9.

No se observa un ensamblaje eficiente de vDLP por la coexpresión de VP2 y VP6 de RVF, únicamente se detectaron vDLP aisladas en las purificaciones realizadas a partir de células Sf9 infectadas, y del medio de cultivo y células infectadas en el caso de H5 (Fig. 34, RVF).

La coexpresión de VP2 y VP6 de RVG permite el ensamblaje eficiente de vDLP, aunque en menor medida que el observado para RVA, o RVD, y únicamente en la línea celular H5. En el caso de los sobrenadantes de infección, sólo se observaron vDLP de RVG aisladas, integras y sin agregar procedentes del sobrenadante de infección de la línea celular H5. El tratamiento con detergentes o Vertrel permitió la extracción de alguna partícula aislada en Sf9. Las partículas extraídas de células H5 fueron mucho más abundantes e integras estructuralmente (Fig. 34, RVG). Por este motivo se eligió la extracción con Vertrel XF de células H5 infectadas como el mejor protocolo para la purificación de vDLP en cantidades adecuadas para su estudio estructural.

En el caso de RVH, la coexpresión de VP2 y VP6 no produce el ensamblaje eficiente de vDLP. En los sobrenadantes de infección únicamente se observa la presencia de tubos de VP6 o vSLP. La observación de las fracciones intracelulares solubles mostró en su mayoría la presencia de fragmentos de vDLP no ensambladas por completo y formando agregados con otras partículas o restos celulares. Sin embargo, se observó alguna partícula correctamente ensamblada, aunque de manera muy minoritaria (Fig. 34, RVH).

Por último, en el caso de RVI la coexpresión de VP2 y VP6 permite un ensamblaje muy eficiente de vDLP, incluso mayor que el observado para RVA. Así, se observaron partículas purificadas del sobrenadante de infección en células H5 y Sf9, siendo H5 la línea en la que se observaron un mayor número de ellas (Fig. 34, RVI). Apenas se consiguió extraer alguna partícula del interior celular, a excepción de células H5 y Sf9 tratadas con Vertrel. A pesar de ello, la mayoría de estas se encontraban agregadas entre ellas o restos celulares. También se observó alguna partícula aislada en células H5 incubadas Tritón X-100 o IGEPAL. En este último caso, se observaron también algunos tubos de VP6 en la fase soluble (Fig. 34, RVI).

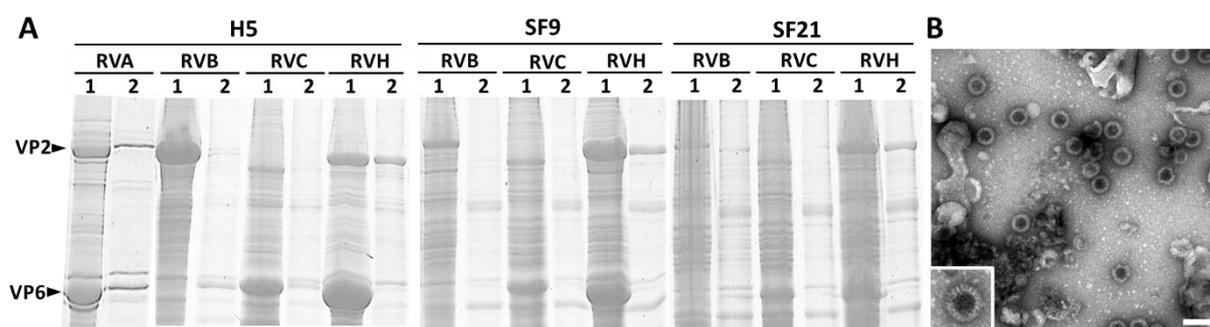


**Figura 34.** Análisis por microscopía electrónica por tinción negativa de ensamblados purificados del interior de células H5 y SF9. Visualización de imágenes de tinción negativa por ME del material ensamblado obtenido tras la infección con rBVs para la expresión de VP2 y VP6 de los grupos A-D F-I de RV. Se indica el grupo de RV correspondiente a cada imagen. Barra de escala a 200 nm.

#### 4.5. Influencia de la actividad proteasa en la formación de vDLP

Uno de los problemas clásicos asociados a la expresión de proteínas mediante rBVs es la frecuente degradación de las proteínas expresadas debido a la presencia de una elevada actividad proteasa en las células de insecto (Gotoh et al., 2001; Naggie & Bentley, 1998), y a la expresión de varias proteasas por el baculovirus empleado como vector (Ishimwe et al., 2015). Es posible que la ausencia de expresión, y/o ensamblaje observado en las producciones de vDLP de RVB, RVC, RVF y RVH, esté relacionada con el procesamiento proteolítico de su VP2 o VP6 en este sistema de expresión. Para disminuir las actividades proteasa en el BEVS se han empleado varias estrategias como el empleo de inhibidores de proteasas durante la infección (Ikonomou et al., 2003) o el empleo de baculovirus de cuyos genomas se han eliminado los genes *v-cath* (Slack et al., 1995) y *chiA* (Hom & Volkman, 2000), que codifican una proteinasa tipo L-catepsina y una chitinasa (Berger et al., 2004). Puesto que añadimos una mezcla de inhibidores de proteasas cada 24 h a partir de las 48 hpi, que ha demostrado ser efectiva en el sistema BEVS (Ikonomou et al., 2003), se evaluó el posible papel de las proteasas L-catepsina y una chitinasa en la formación de vDLP. Para ello, se generaron rBVs que empleando los mismos plásmidos vectores usados anteriormente para generar los recombinantes que expresan las proteínas VP2 y VP6 de RVA, RVB, RVC y RVH pero sobre un genoma que no contiene los genes de esas dos proteasas, denominado MultiBac (Berger et al., 2004).

Una vez generados y amplificados estos rBV, se infectaron células H5, Sf9 y Sf21 y se analizaron los extractos celulares y la formación de ensamblados en los sobrenadantes de infección. Como se muestra en la figura 35A, no se observan diferencias significativas en los patrones de expresión de las proteínas recombinantes en las distintas líneas celulares que podemos relacionar con una disminución de la actividad proteasa. En el caso de RVB, no se observó una banda correspondiente a la proteína VP6 en ninguna línea celular. En RVC y RVH, se observaron bandas de VP2 y VP6 en el análisis bioquímico, tanto en los extractos celulares (Fig. 35 A.1) como en los ensamblados purificados tras el colchón de sacarosa (Fig. 35 A.2), sin embargo, la observación por tinción negativa mediante microscopía electrónica del material particulado purificado de los sobrenadantes de infección no mostró la formación de partículas vDLP en ninguno de los casos para RVB, RVC y RVH, sólo se observaron tubos de VP6 (Fig. 35B). Tampoco se observó un aumento significativo de las vDLP formadas en el caso de RVA (Fig. 35B). Tras observar estos resultados se descartó el uso de estos rBVs al no proporcionar ninguna ventaja frente a los previamente utilizados ya que, aparentemente, la eliminación de estos genes virales (V-cath, chiA) no tiene ningún efecto en el ensamblaje de partículas purificadas del sobrenadante de infección.



**Figura 35. Análisis de la expresión de proteínas VP2 y VP6 y formación de vDLP en rBV MultiBac.** (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de células H5, SF9 y SF21 infectadas con rBV generados empleando el sistema MultiBac que expresan las proteínas VP2 y VP6 de RVA, RVB, RVC y RVH. Se indican las posiciones correspondientes a los extractos celulares como (1) y los sedimentos procedentes de la ultracentrifugación del sobrenadante de infección con (2). (B) Micrografías electrónicas de tinción negativa de los sedimentos obtenidos tras ultracentrifugación de los sobrenadantes de infección en el caso de RVA (células H5). La barra de escala representa 100 nm.

#### 4.6. Caracterización estructural de partículas vDLP de otros grupos de RV

Los experimentos realizados nos permitieron identificar las condiciones para la expresión y purificación de vDLP de RVD, RVG y RVI en cantidades suficientes como para abordar la determinación de su estructura atómica. En primer lugar, nos centramos el estudio de vDLP de RVI y RVD debido a su mayor preservación estructural y mayor facilidad en el proceso de purificación. En el caso de RVG, aunque la extracción con Vertrel XF de células H5 infectadas permite la obtención de cantidades adecuadas de vDLP, las limitaciones de tiempo y mayor complejidad en el protocolo de purificación desaconsejaron su abordaje.

Para producir vDLP a gran escala se utilizaron las condiciones de infección descritas en el apartado 3.2.2. Se infectaron células de insecto con los rBVs duales, Sf9 en el caso de RVD y H5 en el caso de RVI y los cultivos infectados se mantuvieron a 27°C durante 144 hpi. La purificación de las vDLP se llevó a cabo según los protocolos detallados previamente (apartado 3.3.3). Las muestras purificadas enriquecidas se analizaron bioquímicamente mediante SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Este análisis permitió observar, en cada caso, dos bandas de proteína mayoritarias con una movilidad electroforética compatibles con las proteínas estructurales VP2 y VP6 (Fig. 36A-B). Las vDLP fueron vitrificadas y fueron analizadas mediante la observación directa de imágenes de criome (Fig. 36A-B).

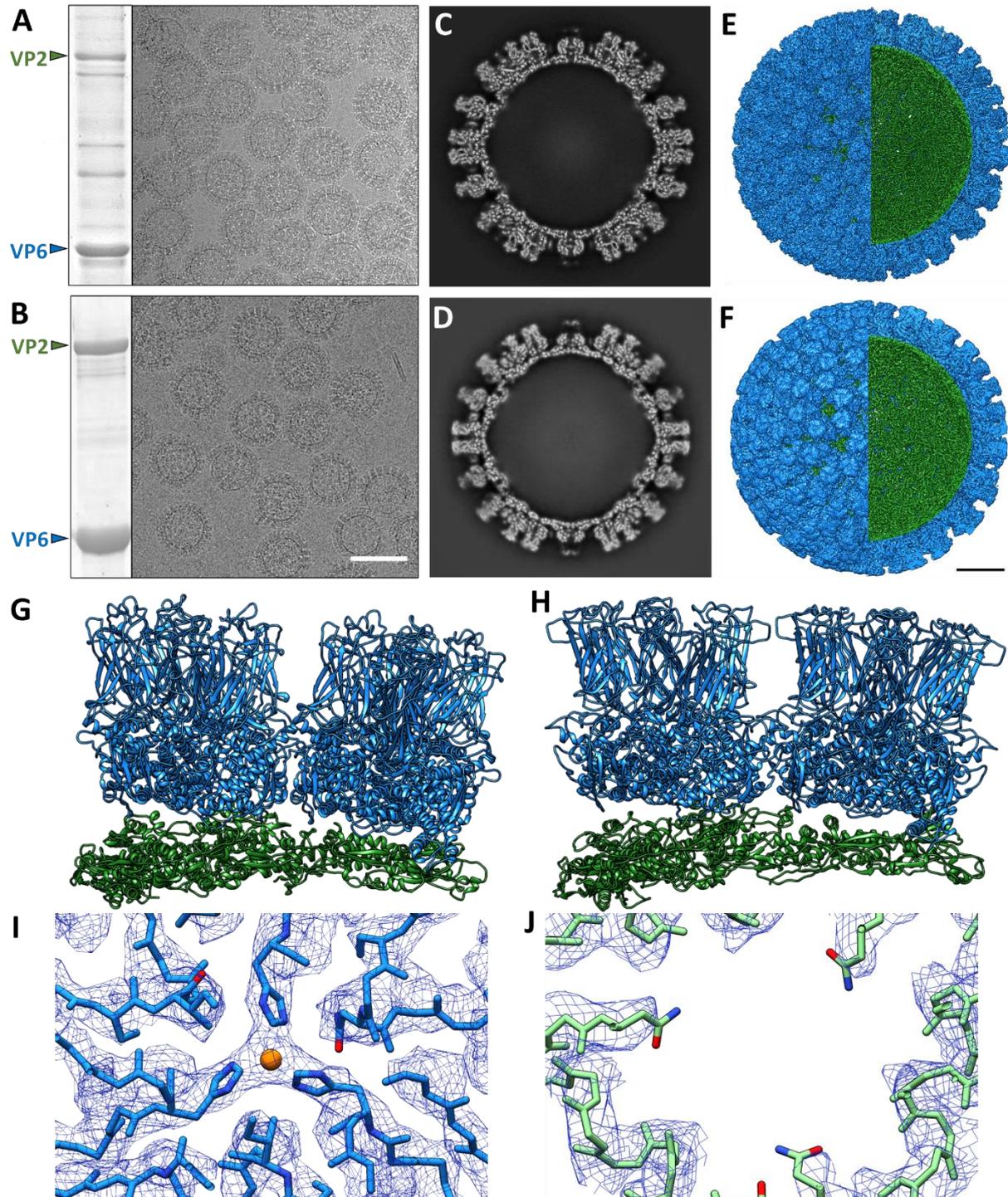
#### **4.6.1. Caracterización bioquímica, análisis por criome y obtención del modelo atómico de las vDLP de RVD y RVI**

La visualización de imágenes de criome mostró partículas homogéneas e isométricas mayoritariamente íntegras y con morfología circular (Fig. 36A-B), que no presentaban material electrodensito en su interior. En el caso de la vDLP de RVI se observó un mayor número de partículas con una menor integridad y parcialmente recubiertas por VP6 (Fig. 36B).

Se tomaron 7698 y 4432 películas de las muestras de vDLP de RVD y RVI, respectivamente, que fueron alineadas y corregidas a partir de su CTF. A continuación, se seleccionaron 5832 y 4432 imágenes, en cada caso, a partir de las cuales se picaron y extrajeron 39781 partículas de vDLP de RVD y 42572 partículas de RVI. Tras la clasificación 2D, se seleccionaron 29713 y 39468 partículas para la vDLP de RVD y RVI, respectivamente, y se realizaron clasificaciones 3D usando el paquete de programas de Relion (Scheres, 2012) utilizando como modelo inicial el mapa de vDLP de RVA generado previamente. Como resultado tras la clasificación de ambas muestras, se obtuvieron dos clases mayoritarias de las que se descartó una de ellas por estar formada por partículas no íntegras y cuya 3DR fue de muy baja resolución. La clase que presentaba la mejor resolución resultó en una 3DR con una resolución final de 3.5 Å en el caso de la vDLP de RVD y 3.7 Å en el caso de la vDLP de RVI, en base a los criterios de FSC 0.143 (anexo 4).

La observación de los cortes centrales y transversales de los mapas 3D permitió observar cápsidas con dos capas concéntricas de proteína definidas en la vDLP de RVD (Fig. 36C) y RVI (Fig. 36D). La capa externa de VP6 de cada mapa se dispone con una simetría T=13 y la capa interna de VP2, inmediatamente subyacente, con una simetría T=1 (Fig. 36E, vDLP RVD; fig. 36F, vDLP RVI). En ambos mapas fue posible visualizar de forma clara elementos de estructura secundaria tanto en la capa de VP2 como en la capa de VP6.

El análisis de la resolución local (anexo 8) mostró una resolución isotrópica en todo el entorno de la cápsida en ambos mapas a excepción de los trímeros pentaméricos y peripentaméricos, en los que la resolución fue menor, especialmente en el caso de la vDLP de RVI.



**Figura 36. Análisis bioquímico y reconstrucción 3D mediante análisis de partículas individuales de vDLP de RVD y RVI.** (A, B) Análisis bioquímico mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de partículas vDLPs purificadas de RVD (A) y RVI (B). Se indican las proteínas estructurales (VP) de RV. Se muestran criomicrografías electrónicas para ambas (Barra de escala a 100 nm). (C, D) Sección central del mapa de densidad de vDLP de RVD (C) y RVI (D) vista a lo largo del eje de simetría de orden dos. (E, F) representación de la estructura 3D de vDLP de RVD (E) y RVI (F) vista a lo largo del eje de simetría de orden dos. Se representa VP6 en azul y VP2 en verde. Las densidades se contornean a  $2\sigma$  por encima de la media. (G-H) Estructura atómica de la subunidad asimétrica de la vDLP de RVD (G) y RVI (H). Se representan las cadenas de VP6 en azul y las cadenas de VP2 en verde. (I-J) Se muestra un corte transversal de los mapas atómicos ajustados en sus mapas de densidad del trímero VP6 de RVD (I) y RVI (J). En el caso de RVD (I), se observa una densidad central coincidente con el ion  $Zn^{2+}$  coordinado por cada una de las histidinas (153H). Se representan algunas cadenas laterales como indicadores de la resolución alcanzada en los mapas.

A pesar de ello, la resolución alcanzada en el resto de trímeros de VP6 así como en la capa de VP2 de ambos mapas fue suficiente como para realizar el ajuste y trazado de sus estructuras atómicas. Utilizando como modelo de referencia la estructura de la vDLP de RVA, se generaron cadenas por homología para cada monómero de VP2 y VP6 de la subunidad asimétrica de la vDLP de RVD y vDLP de RVI.

En primer lugar, se realizó un ajuste de cuerpo rígido de las coordenadas generadas sobre los mapas de densidad. Posteriormente, las coordenadas fueron revisadas manualmente con el programa Coot para optimizar el ajuste a la densidad electrónica, refinadas y validadas con PHENIX (tabla 2, materiales y métodos) (Fig. 36G, RVD. Fig. 36H, RVI). En la vDLP de RVD se pudieron visualizar densidades ubicadas entre los monómeros que forman los trímeros de VP6 correspondientes a posiciones que se encuentran coordinando un ion  $Zn^{+}$  (Fig. 36I). En el caso de la vDLP de RVI (Fig. 36J), no se ha observado esta densidad en su misma posición (representada) ni adyacentes.

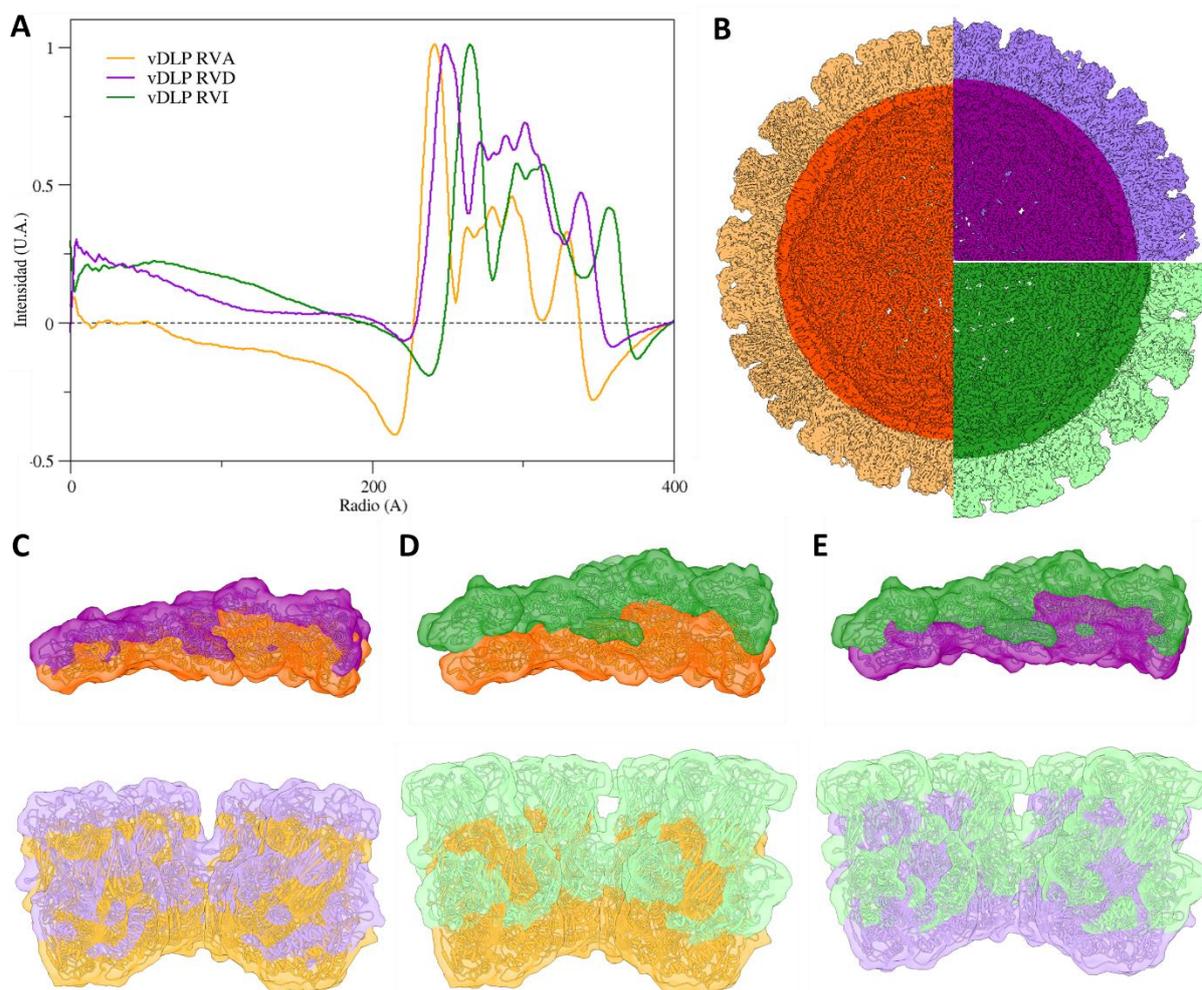
#### 4.6.2. Comparación estructural de las partículas vDLP de RVD y RVI con la partícula vDLP de RVA

Aunque las 3DR de la vDLP de RVD y RVI mostraron una organización estructural similar a la vDLP de RVA (Fig. 36E, F), ambas presentan un mayor tamaño, con una expansión promedio de 8 Å en la vDLP de RVD y 24 Å en el caso de la vDLP de RVI (Fig. 37A-B, tabla 7). Este desplazamiento se puede observar como un movimiento ortogonal conjunto de las capas de VP2 y VP6 (Fig. 37C-D). La vDLP de RVI presenta una expansión de unos 16 Å respecto a la vDLP de RVD (Fig. 37A, B, E).

El análisis detallado de los radios (tabla 7) de las capas VP2 y VP6 de RVA, RVD y RVI muestra que: i) el radio interno de la capa de VP2 de RVD es 10 Å mayor al medido en la vDLP de RVA y 25 Å mayor en el caso de RVI; ii) el grosor de la capa de VP2 (distancia entre el radio interno y externo de VP2) en RVA y RVD es de 40 Å y en RVI es de 45 Å; iii) el grosor de la capa de VP6 es de 85 Å en RVA y RVI, pero de 90 Å en el caso de RVD; y iv) el radio externo de la capa de VP6 es unos 15 Å mayor en RVD y 30 Å mayor en el caso de RVI respecto al encontrado en RVA.

	VP2		VP6
	Radio interno	Intersección VP2-VP6	Radio externo
DLP RVA	230	275	365
vDLP RVA	215	255	340
vDLP RVD	225	265	355
vDLP RVI	240	285	370

**Tabla 7. Análisis de los radios encontrados en las reconstrucciones obtenidas de la DLP de RVA y vDLP de RVA, RVD y RVI.** Se indican los valores de los radios internos de las cápsidas (radio interno VP2) así como los valores de los radios de las cápsidas medidos por la cara externa de la capa de VP6 (radio externo VP6). Se muestran los radios de las cápsidas a nivel de la intersección de las capas de VP2 y VP6 en cada caso. Los valores se muestran en Å.



**Figura 37. Comparación de los mapas de densidad de las partículas vDLP de RVA, RVD y RVI.** (A) Representación de los perfiles radiales de las partículas vDLP de RVA, RVD y RVI. Se representan las curvas correspondientes a los perfiles radiales calculados para cada mapa 3D obtenido de la vDLP de RVA, RVD y RVI. Cada curva se representa en con un color único asociado a cada partícula e indicado en la leyenda del gráfico. (B) Análisis conjunto de los mapas 3D superpuestos de las vDLP de RVA (naranja), RVD (morado) y RVI (verde). Se representan ambas capas VP2 y VP6 coloreadas radialmente con tonos más oscuros y claros, respectivamente. (C-E) Representación de la expansión producida entre las diferentes cápsidas de RVA, RVD y RVI. Vista lateral de parejas de dímeros de VP2 (panel superior) y trímeros de VP6 (panel inferior) en sus posiciones originales en el entorno de la cápsida completa correspondientes de las estructuras de las vDLP de RVA (naranja) y RVD (violeta) (C), RVA (naranja) y RVI (verde) (D) y RVD (verde) y RVI (violeta) (E).

La comparación de las estructuras atómicas obtenidas para la subunidad de VP2 y VP6 (tabla 8) muestra que la homología estructural (z-score) de ambas proteínas en RVA y RVD es mucho mayor que cuando ambas se comparan con RVI. Asimismo, las desviaciones cuadráticas medias (rmsd) de los  $C\alpha$  de VP2 y VP6 entre la vDLP de RVA y RVI son mayores que las observadas entre las partículas vDLP de RVA y RVD.

Al alinear estructuralmente ambos monómeros se observó un desplazamiento de 33 aminoácidos desde el extremo amino terminal de RVD (residuo 171) con respecto al extremo amino de RVA (residuo 138), hasta el extremo carboxilo terminal. Este desfase se correspondería a los 31 aminoácidos adicionales

	Proteínas	rmsd (Å)	z-score	C $\alpha$ alineados	Identidad
<b>vDLPA</b>	VP2	1.9	35.8	775	48
<b>vDLPD</b>	VP6	1.5	44.1	398	37
<b>vDLPA</b>	VP2	4.6	16.5	818	13
<b>vDLPI</b>	VP6	4.5	20.2	395	12
<b>vDLPD</b>	VP2	4	18	818	13
<b>vDLPI</b>	VP6	4.6	20.1	395	12

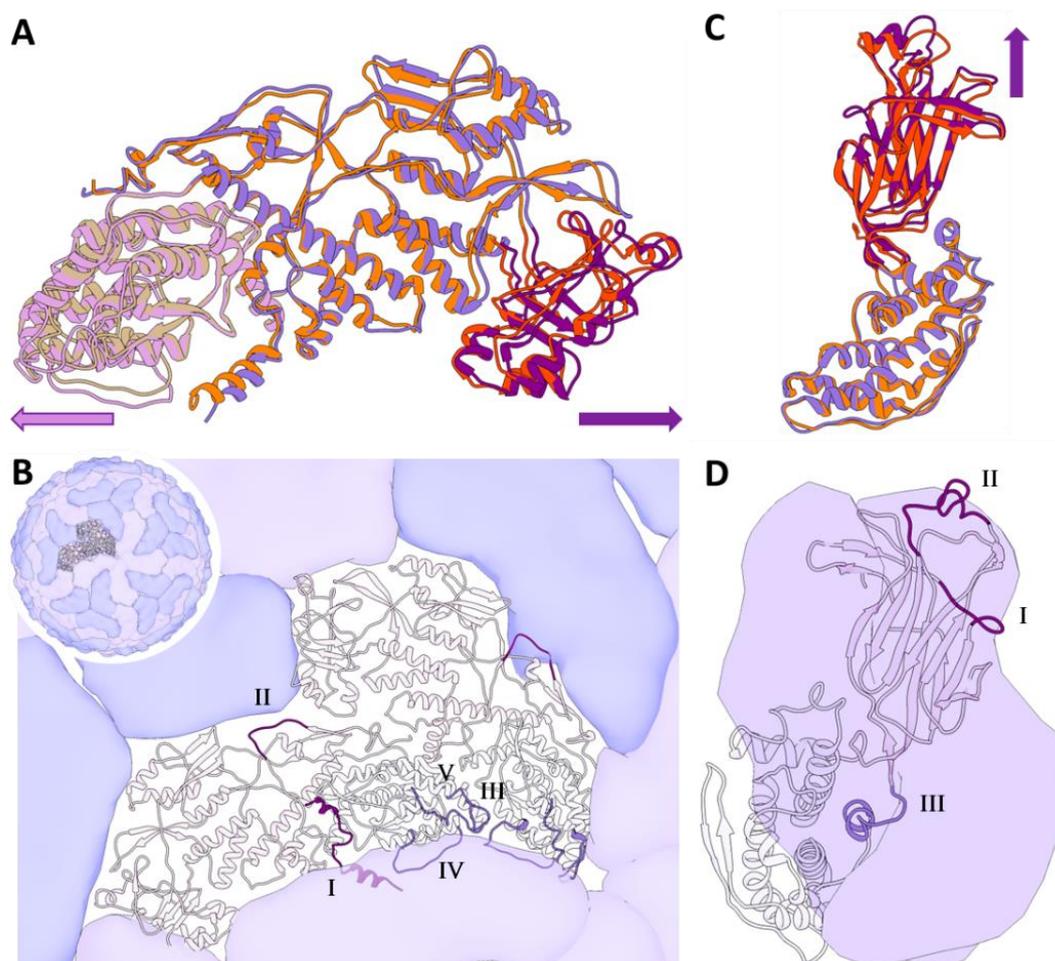
**Tabla 8. Alineamiento estructural y análisis comparativo de las vDLP de RVA, RVD y RVI.** Se muestran los valores obtenidos tras el análisis comparativo de las cápsidas vDLP mediante el servidor Dali. Se indica para cada pareja de cápsidas y monómeros VP2 y VP6 correspondientes los valores de rmsd (desviación cuadrática media) que indica la probabilidad de que el alineamiento sea incorrecto, donde valores más bajos indican mayor fiabilidad; los valores z-score, el cual refleja la similitud estructural entre ambas secuencias, y donde valores más altos indican mayor similitud; el número de C $\alpha$  alineados en cada caso y el porcentaje de identidad de secuencia entre las parejas de VP2 y VP6 alineadas.

encontrados en la secuencia de VP2 de RVD respecto a la VP2 de RVA. Globalmente, la estructura encontrada en la VP2 es similar a la descrita en RVA, aunque se observa una pequeña expansión en RVD hacia ambos extremos por los dominios apical y dimérico (Fig. 38A). En la figura 38B se muestra la subunidad asimétrica de la capa de VP2 de RVD en el entorno de la cápsida y se destacan las regiones que presentan una mayor variabilidad estructural. Estas regiones se corresponden al extremo amino terminal y a puntos de interacción con otros monómeros de VP2 adyacentes por sus regiones central y apical (tabla 9). Cada una de estas regiones se representa marcada en la figura 38B.

Respecto a VP6, el alineamiento de los monómeros de RVA y RVD, muestra un buen ajuste de ambas cadenas tanto en el dominio  $\alpha$ -hélice como en el dominio apical barril- $\beta$  de VP6 (Fig. 38C). A pesar de ello, se observa una mínima expansión producida desde la región central hacia el dominio apical barril- $\beta$  de VP6 de RVD. El alineamiento estructural de ambos monómeros muestra ligeras diferencias en ciertos elementos de estructura secundaria. Estos cambios se localizan en tres bucles del monómero (Fig. 38D, tabla 9). Aunque estos bucles no participan en la interacción intertrímeros, podrían participar en la interacción con la capa externa de VP7.

El monómero de VP2 de RVI conserva la estructura global en forma de coma. El alineamiento estructural con el monómero de RVA muestra cómo la VP2 de RVI no solapa con tanta precisión como en RVD (Fig. 39A RVI, 39A RVD). Además, es posible observar la expansión del monómero de RVI respecto a la VP2 de RVA (Fig. 39A RVI).

Estos datos corroboran lo anteriormente observado en la expansión de la cápsida de RVI respecto a RVA (Fig. 39A, 37A-B). Las diferencias encontradas en la estructura secundaria a lo largo de toda la cadena en RVI son más numerosas que las observadas en RVD. Además de encontrar diferencias en el

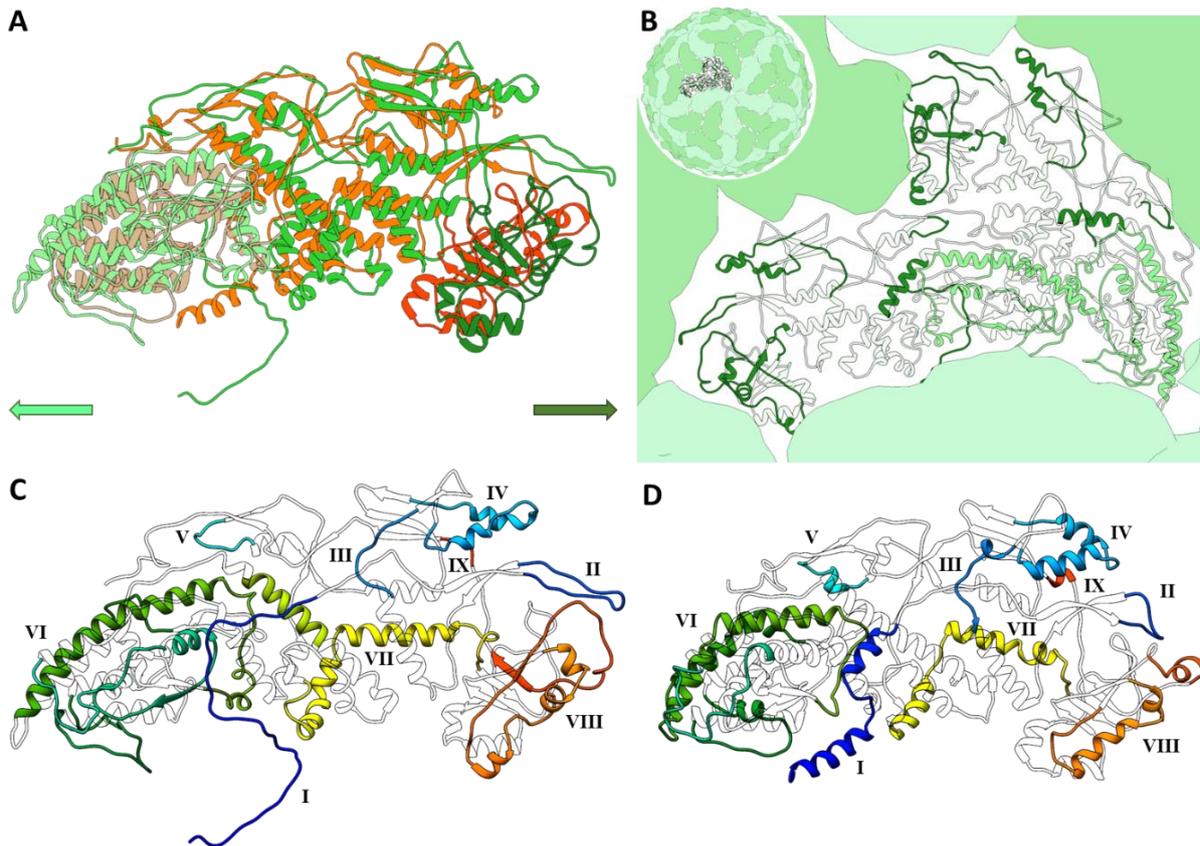


**Figura 38. Análisis y comparación de las estructuras atómicas de VP2 y VP6 en las partículas vDLP de RVA y RVD.** (A, C) Representación de los monómeros VP2B (A) y VP6 (C) de RVA y RVD solapados entre sí. Se observa el dominio central de VP2 de la vDLP de RVA (naranja) alineado con la cadena VP2 de la vDLP de RVD (morado) y cómo se expande radialmente hacia ambos lados, dominio apical (rosa) y dominio dímérico (morado oscuro) respecto a la cadena de la vDLP de RVA. Igualmente, para VP6 (C) se observa la expansión de los dominios  $\alpha$ -hélice basal (morado claro) y  $\beta$ -lamina de RVA (morado oscuro). (B) Representación de las cadenas VP2A y VP2B de RVD en el entorno de la cápsida. Se numeran y marcan en tonos más oscuros las estructuras secundarias en las que se observan mayores diferencias con respecto a RVA: el extremo amino terminal (I), bucle  $\beta 8$ -  $\beta 9$  (II), bucle  $\alpha 10$ - $\alpha 11$  (III), el bucle  $\alpha 13$ - $\alpha 14$  (IV) y el bucle  $\alpha 17$ - $\alpha 18$  (V). (D) Representación de la cadena VP6 de RVD en el entorno del trímero. Se numeran y marcan en tonos más oscuros las estructuras secundarias en las que se observan mayores diferencias con respecto a RVA: el bucle  $\alpha 5$ - $\beta 3$  (I), el bucle  $\beta 10$ - $\beta 11$  (II) y el bucle  $\alpha 6$ - $\beta 16$  (III). Los modelos atómicos se representan mediante el diagrama de cintas.

Regiones VP2		Residuos RVA	Residuos RVD	Principales diferencias
<b>I</b>	Extremo amino terminal	80-112	117-144	Inserción de 4 aa adicionales en RVA
<b>II</b>	Bucle $\beta 8$ - $\beta 9$	290-298	323-332	Bucles con igual longitud y diferente conformación
<b>III</b>	Bucle $\alpha 10$ - $\alpha 11$	352-373	388-405	Bucle con 4 aa adicionales en RVA
<b>IV</b>	Bucle $\alpha 13$ - $\alpha 14$	443-456	475-490	Bucle con 2 aa adicionales en RVD
<b>V</b>	Bucle $\alpha 17$ - $\alpha 18$	518-527	547-556	Bucles con igual longitud y diferente conformación

Regiones VP6		Residuos RVA	Residuos RVD	Principales diferencias
<b>I</b>	Bucle $\alpha 5$ - $\beta 3$	144-149	141-149	Bucle con 3 aa adicionales en RVD
<b>II</b>	Bucle $\beta 10$ - $\beta 11$	254-259	254-261	Bucle con 2 aa adicionales en RVD
<b>III</b>	Bucle $\alpha 6$ - $\beta 16$	308-316	308-318	Bucle con 2 aa adicionales en RVD

**Tabla 9. Regiones con mayor variabilidad estructural entre monómeros VP2 y VP6 de RVA y RVD**



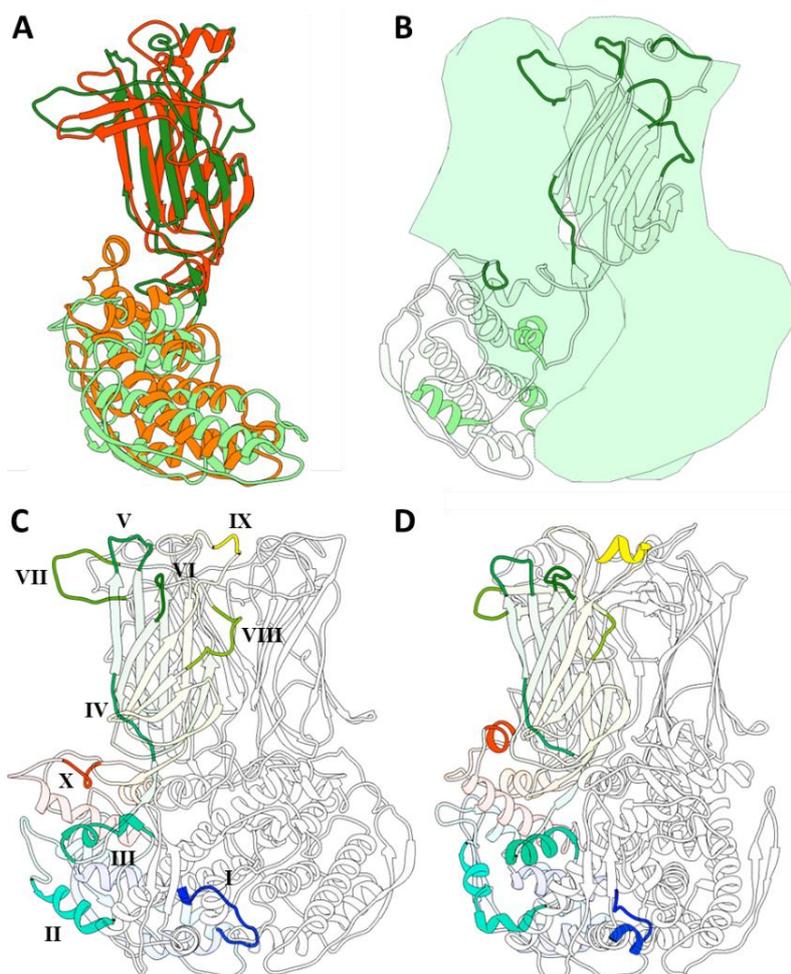
**Figura 39. Análisis y comparación de la estructura atómica de VP2 en las vDLP de RVA y RVI.** (A) Representación de la estructura de VP2B de la vDLP de RVA (dominio apical: color marrón claro, dominio central: naranja y dimérico: naranja oscuro) superpuesta y alineado con la cadena VP2B de la vDLP de RVI (dominio apical: verde claro, dominio central: verde y dimérico: verde oscuro). (B) Representación de las cadenas VP2A y VP2B de RVI en el entorno de la cápsida. Se numeran y marcan en tonos más oscuros las estructuras secundarias en las que se observan mayores diferencias con respecto a RVA. (C-D) Representación frontal de la cadena de VP2B de la vDLP de RVI (C) y RVA (D) coloreadas desde el extremo N-terminal (azul) al extremo C-terminal (rojo). Se indican y numeran las regiones equivalentes en ambas estructuras que presentan una mayor variabilidad entre ellas en tonalidades oscuras (descritas en el texto). Los modelos atómicos se representan mediante el diagrama de cintas.

extremo amino terminal, se observan numerosos cambios en regiones periféricas y centrales del monómero de VP2 de RVI (Fig. 39B). Estas regiones se corresponden tanto a bucles de interacción con monómeros de VP2 adyacentes como a diferentes residuos encontrados a lo largo de la región central de VP2. La figura 39C-D muestra detalles de las regiones equivalentes con una mayor variabilidad estructural (tabla 10) entre las estructuras de VP2 de RVI (Fig. 39C) y RVA (Fig. 39D) coloreadas desde el extremo N-terminal (azul) al extremo C-terminal (rojo).

El alineamiento estructural de ambos monómeros mostró un desplazamiento de 56 aminoácidos en el extremo amino terminal y también cómo este va aumentando hacia el extremo carboxilo terminal debido a numerosas inserciones en la secuencia de VP2 en RVI. El desfase e inserciones observadas se corresponderían a los 100 aminoácidos adicionales encontrados en la secuencia de VP2 de RVI (982 aa) frente a la secuencia de RVA (882 aa).

El solapamiento de los monómeros de VP6 de RVI y RVA (Fig. 40A) no fue tan preciso como en el caso de RVD y RVA (Fig. 38C). Al analizar la estructura del monómero en el contexto del trímero de VP6 (Fig. 40B) podemos observar diferencias estructurales en distintas regiones localizadas tanto en el dominio  $\alpha$ -hélice basal como en diferentes bucles del dominio  $\beta$ -barril de la región apical.

El alineamiento estructural del monómero de VP6 de RVI con el de RVA permite detectar un mayor número de diferencias que las observadas entre RVA y RVD en diferentes zonas del monómero. La figura 40 muestra detalles de las regiones equivalentes con una mayor variabilidad estructural (tabla 10) entre las estructuras de VP6 de RVI (Fig. 40C) y RVA (Fig. 40D) coloreadas desde el extremo N-terminal (azul) al extremo C-terminal (rojo). Estas regiones participan en la interacción intertrímeros y con la capa externa de VP7. También podrían ser las responsables de las diferencias antigénicas de VP6 con respecto a RVA.



**Figura 40. Análisis y comparación de las estructuras atómicas de VP6 de las vDLP de RVA y RVI.** (A) Representación de las cadenas VP6 de RVA (dominio  $\alpha$ -hélice: naranja claro y dominio  $\beta$ -lámina: naranja oscuro) superpuesta y alineado con la cadena VP6 de la vDLP de RVI (dominio  $\alpha$ -hélice: verde claro y dominio  $\beta$ -lámina: verde oscuro). (B) Representación de la cadena VP6 de RVI en el entorno del trímero. Se marcan en tonos más oscuros las estructuras secundarias en las que se observan mayores diferencias con respecto a RVA. (C-D) Representación frontal del monómero de VP6 de la vDLP de RVI (C) y RVA (D) coloreadas desde el extremo N-terminal (azul) al extremo C-terminal (rojo). Se indican y enumeran las regiones equivalentes en ambas estructuras que presentan una mayor variabilidad entre ellas en tonalidades oscuras (descritas en la tabla 10). Los modelos atómicos se representan mediante el diagrama de cintas.

Región VP2	Residuos /región RVA		Residuos/región RVI		Principales diferencias
I	80-113	N-terminal	132-167	N-terminal	Dos $\alpha$ -hélices adicionales en RVA ( $\alpha 1$ y $\alpha 2$ )
II	135-145	bucle $\beta 1$ - $\beta 2$	190-207	bucle $\beta 1$ - $\beta 2$	Inserción de 5 aa adicionales en bucle $\beta 1$ - $\beta 2$ en RVI
III	179-189	bucle $\alpha 3$ - $\beta 3$	242-252	bucle $\alpha 1$ - $\beta 3$	$\eta$ adicional en RVA ( $\eta 1$ )
IV	202-232	bucle $\beta 4$ - $\beta 5$	266-297	bucle $\beta 4$ - $\beta 5$	$\alpha$ -hélices ( $\alpha 2$ , $\alpha 3$ ) más cortos y bucles más largos en RVI
V	276-285	bucle $\alpha 7$ - $\beta 8$	341-349	bucle $\alpha 5$ - $\beta 8$	$\alpha$ -hélice adicional en RVA ( $\alpha 8$ )
VI	354-375	bucle $\alpha 10$ - $\alpha 11$	417-440	bucle $\alpha 8$ - $\alpha 9$	Inserción de 6 aa adicionales en bucle $\alpha 8$ - $\alpha 9$ en RVI
	443-466	bucle $\alpha 13$ - $\alpha 15$	506-530	bucle $\alpha 11$ - $\alpha 12$	$\alpha$ -hélice adicional en RVA ( $\alpha 14$ )
	495-503	bucle $\beta 12$ - $\alpha 17$	564-573	bucle $\beta 12$ - $\alpha 13$	$\alpha$ -hélice adicional en RVA ( $\alpha 16$ )
	528-561	$\alpha 18$ - $\alpha 19$	600-636	$\alpha 14$	La longitud de $\alpha 14$ de RVI abarca dos $\alpha$ en RVA ( $\alpha 18$ - $\alpha 19$ )
	563-575	bucle $\alpha 19$ - $\beta 13$	637-660	bucle $\alpha 14$ - $\beta 13$	Inserción de 8 aa adicionales y una $\eta$ adicional ( $\eta 3$ ) en bucle $\alpha 14$ - $\beta 12$ en RVI
VII	660-677	bucle $\eta 3$ - $\alpha 24$	742-766	bucle $\eta 4$ - $\alpha 20$	6 aa adicionales en bucle $\eta 4$ - $\alpha 20$ en RVI: hay dos $\alpha 18$ - $\alpha 19$ en RVI. En la misma región de RVA se encuentra sólo una $\alpha$ ( $\alpha 23$ )
	678-696	$\alpha 24$ - $\alpha 25$	767-785	$\alpha 20$	La longitud de $\alpha 20$ de RVI abarca dos $\alpha$ en RVA ( $\alpha 24$ - $\alpha 25$ )
	697-702	bucle $\alpha 25$ - $\beta 14$	786-795	bucle $\alpha 20$ - $\beta 14$	Inserción de 4 aa adicionales en bucle $\alpha 20$ - $\beta 14$ en RVI
VIII	771-799	bucle $\alpha 28$ - $\beta 21$	865-903	bucle $\alpha 23$ - $\beta 18$	Inserción de 11 aa adicionales y una $\alpha$ -hélice adicional ( $\alpha 24$ ) en bucle $\alpha 23$ - $\beta 18$ en RVI
	808-818	bucle $\beta 21$ - $\beta 22$	904-930	bucle $\beta 18$ - $\beta 19$	Inserción de 4 aa adicionales y $\alpha$ -hélice adicional ( $\alpha 30$ ) en bucle $\beta 21$ - $\beta 22$ en RVA
IX	837-840	bucle $\beta 22$ - $\beta 23$	938-941	bucle $\beta 19$ - $\beta 20$	$\alpha$ -hélice adicional en RVA ( $\alpha 31$ )

Región VP6	Residuos/región RVA		Residuos /región RVI		Principales diferencias
I	17-27	bucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$	16-29	bucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$	Inserción de 3 aa adicionales en bucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$ en RVI
II	113-128	bucle $\alpha 3$ - $\alpha 5$	114-125	bucle $\alpha 3$ - $\alpha 5$	Inserción de 2 aa adicionales y una $\eta$ adicional ( $\eta 1$ ) en bucle $\alpha 3$ - $\alpha 5$ en RVA
III	133-144	$\alpha 5$	133-144	$\eta 1$ - $\eta 2$	La longitud de $\alpha 5$ de RVA abarca dos $\eta$ en RVI ( $\eta 1$ - $\eta 2$ )
IV	155-161	bucle $\beta 3$ - $\beta 4$	154-160	bucle $\beta 3$ - $\beta 4$	Inserción de 2 aa adicionales en bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ en RVA
V	169-176	bucle $\beta 4$ - $\beta 5$	168-177	bucle $\beta 4$ - $\beta 5$	Inserción de 3 aa adicionales en bucle $\beta 4$ - $\beta 5$ en RVI

Tabla 10. Regiones con mayor variabilidad estructural entre monómeros VP2 y VP6 de RVA y RVI

<b>VI</b>	195-204	bucle $\beta 6$ - $\beta 7$	197-201	bucle $\beta 6$ - $\beta 7$	Inserción de 8 aa adicionales en bucle $\beta 6$ - $\beta 7$ en RVA
<b>VII</b>	240-245	bucle $\beta 9$ - $\beta 10$	230-240	bucle $\beta 9$ - $\beta 10$	Inserción de 3 aa adicionales en bucle $\beta 9$ - $\beta 10$ en RVI
<b>VIII</b>	254-258	bucle $\beta 11$ - $\beta 12$	248-257	bucle $\beta 11$ - $\beta 12$	Inserción de 4 aa adicionales en bucle $\beta 11$ - $\beta 12$ en RVI
<b>IX</b>	302-307	bucle $\beta 15$ - $\beta 16$	299-303	bucle $\beta 15$ - $\beta 16$	$\alpha$ -hélice adicional en RVA ( $\alpha 6$ )
<b>X</b>	368-372	bucle $\alpha 6$ - $\alpha 7$	367-371	bucle $\alpha 7$ - $\alpha 9$	$\alpha$ -hélice adicional en RVA ( $\alpha 8$ )

**Tabla 10. Regiones con mayor variabilidad estructural entre monómeros VP2 y VP6 de RVA y RVI (Continuación)**

La organización cuaternaria entre las estructuras atómicas de las vDLP de RVA, RVD y RVI fue semejante (Fig. 24D, 36E y F). Sin embargo, las cápsidas de RVD y RVI mostraron un aumento promedio de 8 Å y 24 Å, respectivamente, en sus radios (Fig. 37A-B, tabla 7). La identidad de secuencia de la VP2 y VP6 entre RVA y RVD es mayor entre sí con respecto a la de RVI (tabla 8).

Tanto en RVD como en RVI, la VP2 mantiene su estructura terciaria aunque ambas presentan una expansión hacia los extremos por los dominios apical y dimérico (Fig. 38A, 39A). En RVD las regiones con mayor variabilidad se corresponden al extremo amino terminal y a algunos bucles de interacción con otros monómeros de VP2 adyacentes. En RVI, además de ello, se observan numerosas diferencias en toda la molécula (Fig. 38B, 39B, tabla 9 y 10), probablemente relacionadas con el mayor tamaño de esta y la menor identidad de secuencia observada con respecto a RVA. La estructura terciaria encontrada de la VP6 en RVD y RVI fue similar a la de RVA. En RVD se observó una ligera expansión y sólo se observaron variaciones, con respecto a la VP6 de RVA, en su estructura secundaria en tres bucles localizados en la periferia del monómero (Fig. 38D, tabla 9). Las diferencias encontradas en la estructura secundaria de la VP6 de RVI son más numerosas y se localizaron tanto en regiones periféricas como en regiones centrales del monómero (Fig. 40B-C, tabla 10).

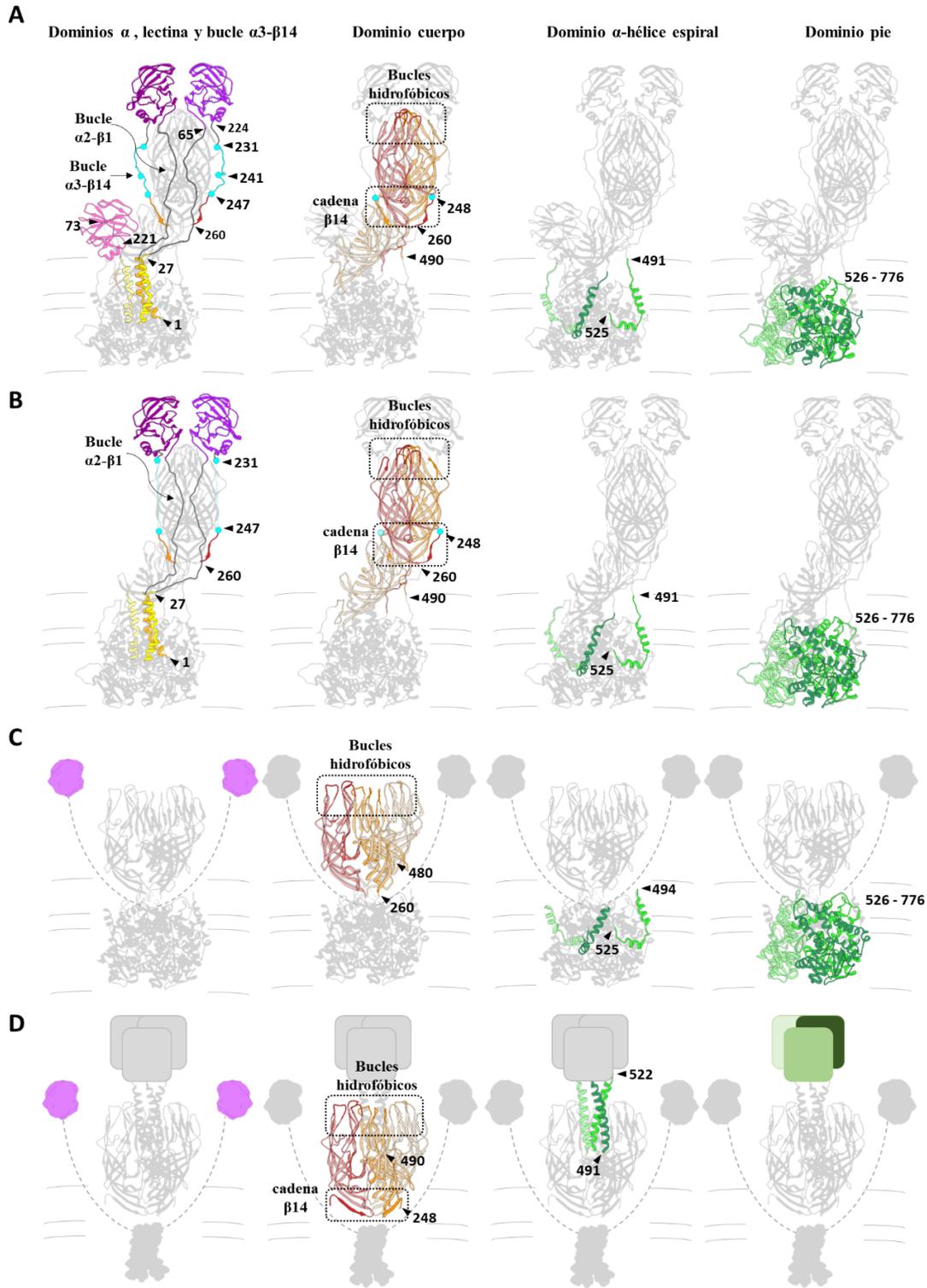
## *Discusión*

---

### 5.1. Implicaciones estructurales de la activación de la espícula de rotavirus

El primer desafío al que se enfrenta una partícula viral para generar una infección productiva es reconocer la célula huésped diana y superar las barreras que la rodean. Estos pasos son básicos para definir la virulencia y el rango de hospedador del virus (Lozach et al., 2011; Marsh & Helenius, 2006; Yamauchi & Greber, 2016). Al inicio de la infección, el virión debe reconocer y unirse a la superficie celular. Una vez reconocido el receptor o receptores celulares, la entrada puede ocurrir directamente a través de la membrana celular o mediante la internalización endocítica de la partícula (Lozach et al., 2011; Marsh & Helenius, 2006; Yamauchi & Greber, 2016). Independientemente del camino utilizado, la naturaleza de la partícula viral define el mecanismo de penetración y entrada. Mientras que para los virus con envuelta la penetración implica la fusión de las membranas viral y celular, para los virus sin envoltura la penetración está mediada bien por la formación de poros en la membrana o bien, por la lisis de la misma (Burckhardt & Greber, 2009; Greber, 2002; Luisoni et al., 2015; Siczekarski & Whittaker, 2004). Diferentes estudios estructurales han proporcionado un conocimiento relativamente detallado de los procesos de fusión de membranas (P. Dormitzer et al., 2004; Kielian & Rey, 2006; Más & Melero, 2013), sin embargo, los mecanismos de penetración de los virus sin envoltura son menos conocidos (Suomalainen & Greber, 2013).

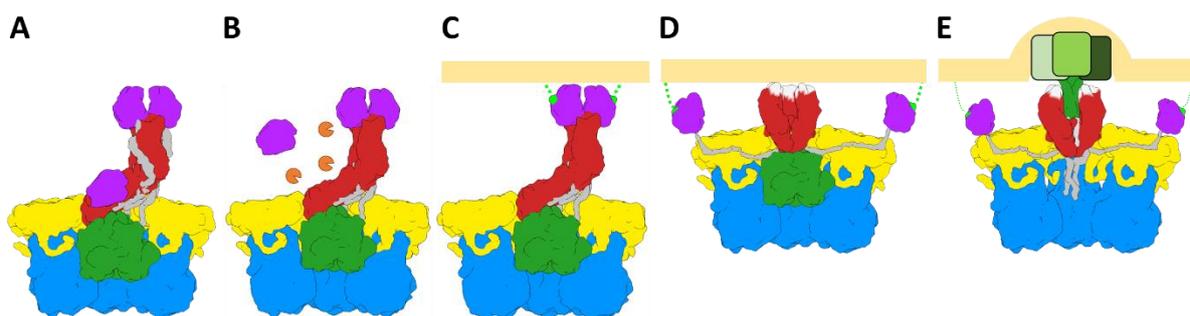
Durante la presente tesis, mediante la combinación de reconstrucción localizada de subpartículas (Ilca et al., 2015), promediado de partículas heterogéneas mediante flujo óptico (Kazemi et al., 2021) y corrección de amplitudes mediante filtro de espiral (Kaur et al., 2021), hemos desarrollado un protocolo de procesamiento de imagen que nos ha permitido construir un modelo atómico de la espícula de RV no activada, superando las limitaciones de resolución encontradas derivadas de la flexibilidad intrínseca de la espícula, especialmente alta en el caso del dominio lectina de la subunidad C, y de la ocupación parcial de sus posiciones alrededor de la TLP. El análisis comparativo de las espículas NTR y TR muestra que, mientras que en la espícula TR los dominios lectina (residuos 65-224) de la cabeza están unidos covalentemente al dominio  $\alpha$  (residuos 1-27) del pie a través del largo bucle interno  $\alpha 2$ - $\beta 1$  (residuos 28-64) (Fig. 41B), en la espícula NTR están también unidos al dominio barril- $\beta$  del cuerpo de la otra subunidad de VP4 a través del bucle  $\alpha 3$ - $\beta 14$  (residuos 225-230), donde se encuentran los sitios de procesamiento R231, R241 y R247, y la cadena  $\beta 14$  (residuos 252-258). Este segmento “abrazo” el dominio barril- $\beta$  y establece interacciones con el mismo (Fig. 41A). El bucle  $\alpha 3$ - $\beta 14$  interacciona con la región  $\beta 24$ - $\beta 26$  (residuos 434-448) de la otra cadena, mientras que la cadena  $\beta 14$  se incorpora al barril- $\beta$  del cuerpo de la otra subunidad (Fig. 41A). El primer paso para el cambio conformacional de la espícula tras su unión al receptor es el desplazamiento lateral de sus dominios lectina, que permanecen unidos a la partícula durante todo el proceso a través del bucle  $\alpha 2$ - $\beta 1$  (Fig. 41B). En la espícula no activada por tripsina, la presencia del bucle  $\alpha 3$ - $\beta 14$  unido covalentemente al dominio lectina, y que interacciona con el barril- $\beta$  de la subunidad contraria, impide el desplazamiento de estos dominios lectina y, por lo tanto, actúa como un “seguro” que previene la exposición temprana de los bucles



**Figura 41. Transiciones estructurales de la espícula de RV durante la entrada celular.** Reordenamientos de las proteínas de la espícula (VP4, VP8\* y VP5\*) durante la transición desde su conformación inactiva, NTR (A), pasando por su forma activada, TR (B), e intermedia (C) hasta su conformación invertida. (D). Los dominios no observados en las estructuras atómicas obtenidas se representan de forma esquemática (panel C: dominios lectina; panel D: dominios lectina, dominio  $\alpha$  y pie). Los distintos dominios de las proteínas están coloreados por separado para ilustrar su cambio conformacional: dominio  $\alpha$ -amino: naranja, amarillo, dorado; dominios lectina, magenta, morado y rosa; bucle  $\alpha$ 3- $\beta$ 14: azul; dominios del cuerpo, rojo, naranja y salmón; dominios  $\alpha$ -hélice espiral y pie: verde claro, verde y verde oscuro. Las conexiones entre los dominios  $\alpha$ -amino y lectina de los paneles C y D se indican mediante líneas discontinuas. Las flechas indican diferentes residuos que delimitan los diferentes dominios coloreados en cada panel. Los paneles correspondientes al dominio cuerpo se muestran con transparencia y marcando en un tono más oscuro tanto los bucles hidrofóbicos como la cadena  $\beta$ 14.

hidrofóbicos protegidos bajo los dominios lectina (Fig. 41A). Tras la proteólisis y pérdida del segmento peptídico 232-247, únicamente se mantendría la interacción del segmento 225-231 con el cuerpo de la espícula, lo que “liberaría” este seguro y convertiría la espícula inactiva en una en espícula activa y preparada para el cambio conformacional (Fig. 41C-D).

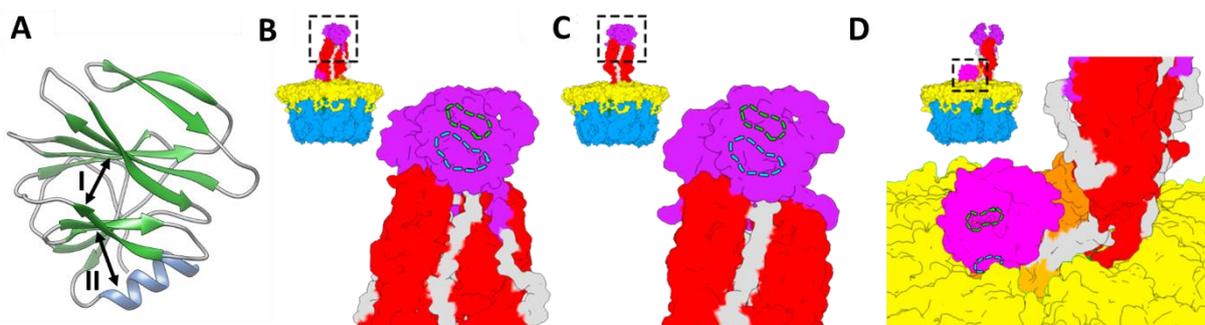
Este mecanismo de penetración de membrana de rotavirus presenta numerosos paralelismos con el de las proteínas de fusión de tipo I de virus con envuelta, como la proteínas HA de influenza, S de coronavirus (S) y env de HIV (Battles & McLellan, 2019; Benton et al., 2020; P. Dormitzer et al., 2004; Stephen C. Harrison, 2008; Herrmann et al., 2021; Jackson et al., 2022). De forma general, estas proteínas de fusión son sintetizadas como trómeros de un polipéptido precursor que debe ser proteolizado para adquirir su actividad fusogénica. En la mayoría de los casos, el fragmento N-terminal (HA1, S1 o gp120) contiene un motivo de unión al receptor mientras que producto C-terminal (HA2, S2 o gp41) contiene un péptido de fusión en su extremo amino y está anclado a la membrana viral por su región carboxilo. Tras la unión al receptor, el dominio N-terminal se retira y se inserta el péptido del fragmento C-terminal en la membrana diana generando un intermedio denominado “*prehairpin*”. Finalmente, se produce un repliegue de la proteína a su forma postfusión para juntar el péptido de fusión y el extremo carboxilo anclado a la membrana viral. Esta transición incluye la generación o extensión de un haz de tres hélices superenrolladas. Además de la similitud de este mecanismo con la anteriormente descrita para VP8\* y VP5\* (Fig. 42), la determinación de la estructura de la espícula NTR, nos permite establecer un nuevo paralelismo en el mecanismo molecular por el que la proteólisis conduce a la activación de esta. En el caso de las proteínas de fusión, la proteólisis en la región



**Figura 42. Transiciones estructurales durante la entrada de RV.** Representación esquemática de los cambios conformacionales propuestos actualmente de la espícula de RV durante la penetración de la membrana. VP6 está coloreado en azul, VP7 en amarillo, pie de VP4/VP5\* en verde,  $\beta$ -barril de VP4/VP5\* en rojo, dominio de lectina VP4/VP8\* en magenta y bucles en gris. (A) Las tres subunidades de VP4 sin procesar se ensamblan como un trímero asimétrico en la TLP. Dos subunidades de VP4 forman el cuerpo y la cabeza de la espiga (cadenas A y B) unidos por bucles (gris) entre sí, mientras que los dominios de barril  $\beta$  y lectina de la tercera subunidad se encuentran formando el tallo (cadena C). (B) La activación con tripsina escinde VP4 en las proteínas VP5\* y VP8\* que preparan a la espícula para los posteriores cambios conformacionales. El dominio de lectina ubicado en el tallo se disocia tras el procesamiento proteolítico. (C) Unión inicial a la célula huésped a través de la interacción de los dominios de lectina VP8\* con los glicanos de superficie (verde claro) de la membrana celular. Esta interacción precede el cambio conformacional (D) en el que los dominios de lectina se separan y exponen los bucles hidrofóbicos de VP5\* (blancos) que da lugar a una conformación ‘invertida’ (E) en la que los loops hidrofóbicos del cuerpo del pie de la espícula interactúan y se insertan en la membrana produciendo la distorsión y ruptura de esta.

N-terminal del péptido de fusión permite la liberación de este y su inserción en la membrana diana. En RV la proteólisis del bucle  $\alpha$ 3- $\beta$ 14 es un paso necesario para la exposición de los bucles hidrofóbicos que ejercen esta función.

Además de las diferencias arriba descritas, la espícula NTR presenta un tercer dominio lectina (cadena C) en el tallo de la espícula (Fig. 41A). La presencia de este dominio y su alto grado de flexibilidad han sido descritos previamente a partir del promediado y clasificación de subtomogramas de espículas de NTR-TLP (Rodríguez et al., 2014). La metodología de análisis de partículas individuales puesta a punto ha permitido la generación de un modelo atómico para el mismo desde la T73 hasta la N221. Este dominio lectina, al igual que los presentes en la cabeza de la espícula, presenta un plegamiento de tipo galectina con un  $\beta$ -sándwich antiparalelo formado por dos  $\beta$ -láminas separadas por una hendidura poco profunda (Fig. 43A) (P. R. Dormitzer et al., 2002). Han sido descritos dos sitios de unión a glicanos en el dominio lectina de la espícula de RV. El primero (Fig. 43A, sitio I) se localiza en la hendidura del  $\beta$ -sándwich y, en diferentes genotipos P de RVA, se ha descrito su unión a SA, antígenos de histocompatibilidad sanguíneos (*histoblood group antigens*, HBGA) y precursores de tipo II de los mismos (P. R. Dormitzer et al., 2002; L. Hu et al., 2015; L. Hu, Crawford, Czako, et al., 2012). El segundo sitio de unión es adyacente al anterior (Fig. 43A, sitio II) y se ha descrito su unión a HBGA y precursores de tipo I (Y. Liu et al., 2017). Ambos sitios están accesibles en los dominios lectina de la cabeza tanto en la espícula NTR como en la TR (Fig. 43B-C). Este hecho correlaciona con la capacidad de unirse a la célula hospedadora de las TLP NTR a pesar de ser incapaces de dar lugar a infecciones productivas (Arias et al., 1996; Gilbert & Greenberg, 1998; D. Y. Graham & Estes, 1980; Rodríguez et al., 2014). En el caso del dominio lectina localizado en el tallo de la espícula NTR, su posición más proximal a la cápsida lo hace intrínsecamente menos accesible que los dominios lectina de la cabeza. Además, aunque el sitio I está expuesto al medio, la presencia de la capa de VP7 limitaría el acceso al sitio II (Fig. 43D).

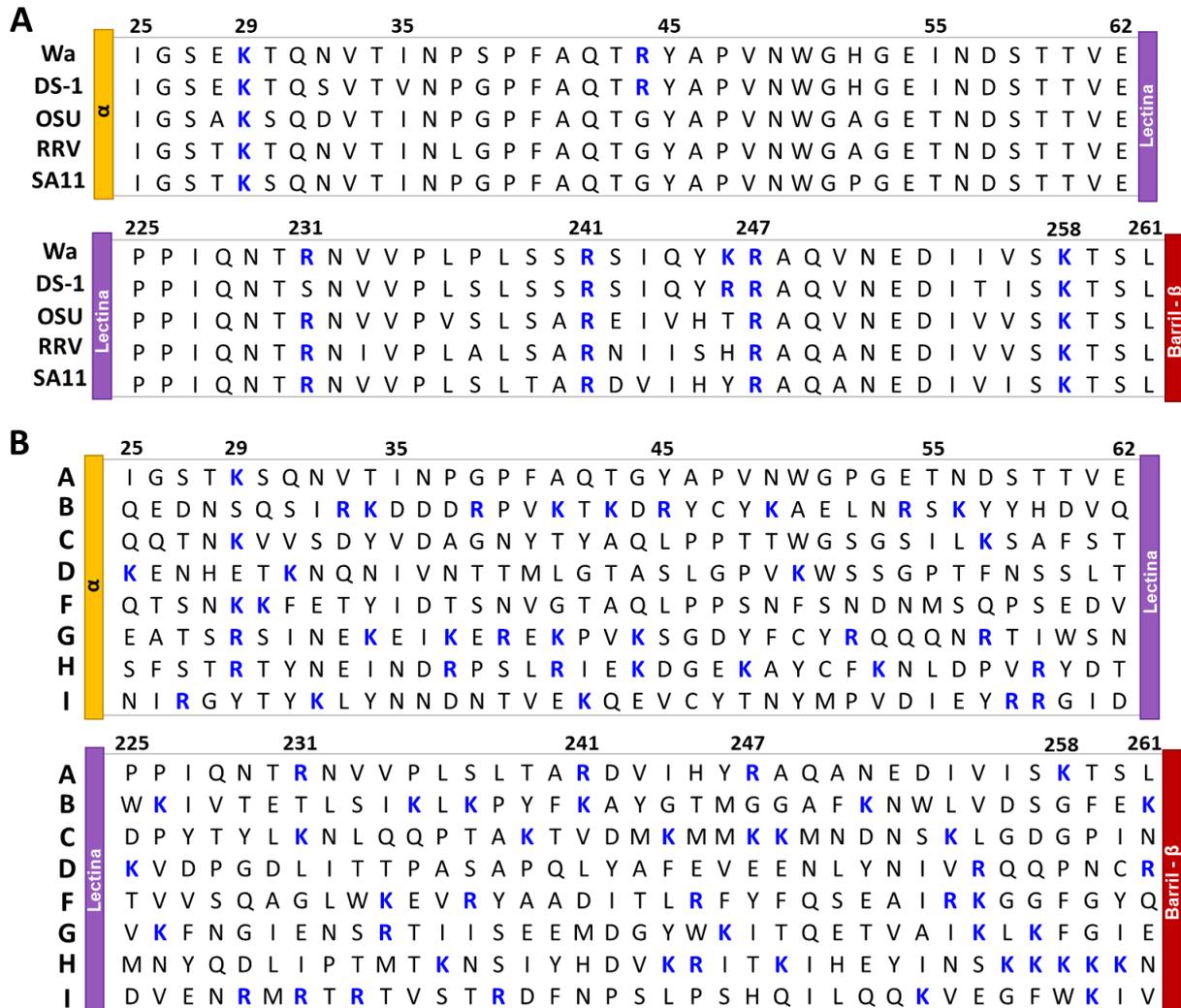


**Figura 43. Accesibilidad de los sitios de unión a glicanos de los dominios lectina.** (A). Representación del dominio VP8\* de SA11 (PDB 1KQR) coloreado según su estructura secundaria. Se indican los sitios de unión a glicanos localizados en la hendidura entre las  $\beta$ -láminas (I) y adyacente a ella (II). (B-D) Accesibilidad de los sitios I (línea verde) y II (línea azul) en los dominios lectina de la cabeza (B, C) y tallo (D) de la espícula NTR (B, D) y TR (C).

En cualquier caso, su ausencia en la espícula TR implica que es prescindible para el desarrollo de su función de unión a glicanos. Desconocemos si este dominio desarrolla una función específica en el tallo de espícula NTR o si su presencia es un remanente en una espícula que ha evolucionado para, a partir de tres subunidades idénticas, plegarse en una estructura parcialmente trimérica (pie) y parcialmente dimérica (cuerpo-cabeza) que ha transformarse en una estructura totalmente trimérica para unirse a la membrana y penetrarla. Por otro lado, el análisis de potenciales sitios de tripsinización de la espícula NTR muestra que, en las cadenas A y B, únicamente se encuentran expuestas las dianas R231, R241, R247 del bucle  $\alpha 3$ - $\beta 14$  y que el bucle  $\alpha 2$ - $\beta 1$  (27-64) se encuentra protegido por el tallo y el cuerpo (Fig. 41A). En la subunidad C de VP4 estos bucles se encuentran desordenados y expuestos al medio, con lo que, además de los sitios antes descritos, aparecen dos potenciales sitios de tripsinización adicionales: K29 y K258 (Fig. 18B). El análisis del mapa de la espícula TR muestra una discontinuidad abrupta de la densidad electrónica en ambos puntos. La liberación y pérdida del dominio lectina de la subunidad C, observado en todas las estructuras TR resueltas, podría derivar del corte en la K29 (Herrmann et al., 2021; Settembre et al., 2011). Por otra parte, la estructura de la conformación invertida de la espícula resuelta por Herrmann y colaboradores (Fig. 41D) muestra la presencia de los residuos 248-258 (bucle  $\alpha 3$ - $\beta 14$ ) en las tres subunidades de VP5\*, lo que implica que en dichas condiciones la subunidad C no es procesada en la K258.

El análisis de la conservación de las dianas de procesamiento por tripsina en diferentes especies de RVA (Fig. 44A) humanas (Wa, DS-1) y animales (SA11, RRV, OSU) muestra una clara conservación tanto de los sitios canónicos (R231, R241, R247) como de K29 y K258. Únicamente en la cepa DS-1 no se observó esta conservación en la R231, aunque sí en el resto de su secuencia. Al extender esta comparación a las secuencias de referencia para otros grupos de rotavirus (B-D, F-I) utilizadas en este estudio (Fig. 44B) se observó que todos los grupos presentan dianas de tripsinización en el residuo 29 o cerca del mismo. Es más, con la excepción de RVA, todos los otros grupos presentan al menos dos sitios de tripsinización en el bucle  $\alpha 2$ - $\beta 1$  y algunos grupos como B, G, H e I tienen entre 5 y 9 posibles sitios susceptibles de proteólisis. De forma análoga, el bucle  $\alpha 3$ - $\beta 14$  tiene entre 4 y 9 dianas de tripsinización en todos los grupos. A este respecto, destaca la presencia de 5 lisinas alrededor de la posición 258 en RVH. La mayoría de las proteínas de fusión de tipo I son activadas por proteasas tipo tripsina y/o furina y tanto la naturaleza de la proteasa utilizada como la secuencia del bucle diana se han relacionado con el tropismo y la patogenicidad de algunos de estos virus (Bertram et al., 2010; Jackson et al., 2022). En el caso de RV, la sustitución de uno de los sitios de procesamiento monobásico por tripsina (R247) por un sitio multibásico de procesamiento por furina (RXR/KR) provoca la acumulación intracelular de viriones (Komoto et al., 2011). Este hecho se ha asociado a que el procesamiento intracelular de la espícula por la furina (una familia de proteasas endógenas y ubicuas residentes en el aparato de Golgi) provoca una activación temprana de la espícula y conduce a su unión con las membranas celulares. La aparición de sitios monobásicos adicionales en los bucles  $\alpha 2$ - $\beta 1$  y  $\alpha 3$ - $\beta 14$

en algunos grupos de rotavirus podría aumentar la eficiencia de procesamiento de estos bucles en el tracto gastrointestinal, localización natural donde se liberan las nuevas partículas ensambladas tras la infección.



**Figura 44. Representación de las secuencias de aminoácidos de VP4 de diferentes cepas de RV.** Se representan las secuencias de aa de VP4 de diferentes cepas de RVA (A): Wa, DS-1, OSU, RRV, SA11 entre sí y de la cepa SA11 con las secuencias de las cepas de las especies de otros RV (B-D, F-I) estudiadas (B). En la parte superior se cada panel se indica el rango de residuos representados en cada punto (residuos 25 al 35, en el bucle  $\alpha_2$ - $\beta_1$ , entre los dominios  $\alpha$  y lectina y residuos del 225 al 261 en el bucle  $\alpha_3$ - $\beta_{14}$  entre los dominios lectina y barril- $\beta$  del cuerpo de la espícula) y los residuos específicos de interés (29, 231, 241, 247, 258). Los residuos susceptibles de ser cortados por tripsina, lisina (K) y arginina (R), se marcan en color azul. Todos los aa se presentan con el código de una sola letra.

## 5.2. VLPs como modelo para la caracterización estructural de partículas virales de rotavirus

El segundo objetivo general de este trabajo pretende abordar el estudio sistemático de la estructura de los miembros del género rotavirus empleando VLP como material de trabajo. Para determinar la viabilidad de esta aproximación comparamos la estructura atómica de la vDLP del RVA con la estructura de la DLP natural. Para ello, generamos vDLP en el sistema BEVS mediante la expresión de

las proteínas VP2 y VP6 de la estirpe SA11 de rotavirus. En paralelo purificamos DLP a partir de TLP generadas mediante la infección de rotavirus SA11 en células MA104. Una vez purificadas, analizamos mediante criome ambas tipos de partículas.

La resolución de la estructura de la DLP y vDLP de RVA a 3.1 y 3.9 Å, respectivamente, nos ha permitido construir un modelo atómico de las mismas y determinar que, de forma general, presentan un alto grado de identidad estructural con una estructura secundaria y terciaria conservada a lo largo de toda la secuencia, tanto de VP2 como de VP6. Este resultado es garante del uso de vDLP de especies no cultivables de RV como modelo para el estudio de la estructura de sus contrapartidas naturales. Sin embargo, y a pesar de su gran similitud, se han observado dos cambios fundamentales en la estructura de la partícula: i) la DLP natural presenta un mayor diámetro que la vDLP y ii) mientras la DLP presenta una resolución y ocupancia isotrópica, estas se observan disminuidas en los trímeros pentaméricos (P) y peripentaméricos (P') de VP6 en la vDLP.

El radio interno de la DLP presenta un incremento de 15 Å (de 215 a 230) respecto a la vDLP, el cual implica un aumento del volumen interno del 21% en la DLP (de  $42 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$  a  $51 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$ ). Este incremento podría estar relacionado con la presencia de VP1, VP3 y/o el genoma viral. El mapa de densidad de la DLP presenta hasta 8 capas concéntricas de densidad en el interior del *core* que corresponderían al dsRNA genómico en el que se observa un espaciado interhélices promedio de 29 Å. Este valor es similar al reportado previamente por Jenni y colaboradores (Jenni et al., 2019). Si consideramos: i) el dsRNA como un cilindro con un diámetro equivalente a este espaciado, ii) un paso de rosca de 2.8 Å/bp, y iii) que RVA posee un genoma de 18.5 kbp, dicho genoma ocuparía un volumen teórico de unos  $34 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$  (Desselberger, 2020), es decir, un 80% y un 67% del volumen disponible en el *core* de la vDLP y la DLP, respectivamente. Si, además, consideramos el volumen ocupado por hasta 12 moléculas de VP1 ( $2 \cdot 10^5 \text{ \AA}^3$  por copia) y VP3 ( $1.6 \cdot 10^5 \text{ \AA}^3$  por copia) junto con el genoma, el *core* se encontraría ocupado en un 91% y un 75%, respectivamente. Durante los últimos años, tras el desarrollo del sistema de genética reversa a partir de plásmidos (Kanai et al., 2017; Komoto et al., 2018, 2020), se han generado RV recombinantes con insertos heterólogos de hasta 2.5 kbp (Philip & Patton, 2021). Este incremento supondría una ocupación del 103% y del 83% del volumen interno de la vDLP y DLP, respectivamente. El espaciado interhélices en el interior de la DLP es fundamental para la transcripción y replicación viral (Pesavento et al., 2001). Aunque se desconoce exactamente cuál es el espaciado intercadenas mínimo necesario para desarrollar esta función, sabemos que son procesos altamente dinámicos que requieren que las moléculas de RNA (tanto dsRNA como ssRNA) se muevan a través de la maquinaria de replicación/transcripción. Además, este espacio debe contener un exceso de cationes divalentes que contrarresten la carga negativa del RNA (Desselberger et al., 2013) y permita las interacciones para la flexión del dsRNA (Lipfert et al., 2014). El mayor volumen interno de la DLP podría, por lo tanto, estar relacionado con la funcionalidad de la partícula para su transcripción y replicación.

Diversos estudios sobre el mecanismo de ensamblaje de diferentes virus muestran una expansión en el tamaño de sus cápsidas tras el empaquetamiento del genoma y proteínas virales. Así, bacteriófagos dsDNA como HK97 (Hendrix & Johnson, 2012), P22 (D. H. Chen et al., 2011), T7 (Ionel et al., 2011) o P23-45 de *Thermus thermophilus* (Bayfield et al., 2019), así como otros virus dsDNA como los virus del herpes (Brown & Newcomb, 2011) forman una partícula inmadura precursora (la procápside) de menor radio que, tras el empaquetamiento del genoma viral (mediado por la hidrólisis de ATP) se transforma en una partícula madura con un diámetro mayor. Los miembros de la familia *Cystoviridae* comparten similitudes estructurales con los de *Reoviridae* (Huiskonen et al., 2006). Los virus de ambas familias de virus dsRNA poseen un capa interna  $T = 1$  que contiene múltiples copias de una RNA polimerasa viral dependiente de RNA (Butcher et al., 1997). Sin embargo, los *Cystoviridae* son los únicos virus dsRNA conocidos que empaquetan (+)ssRNA por translocación en cápsidas preensambladas (Kainov et al., 2003). El virus más estudiado dentro de esta familia es el virus *Pseudomonas*  $\phi 6$ . Durante su ensamblaje forma una cápsida en forma de dodecaedro vacía, denominada procápside y formada por 60 dímeros de la proteína central P1. A continuación, los segmentos de (+)ssRNA se desplazan al interior de la procápside dando lugar a la expansión de ésta. Tras el empaquetamiento de las cadenas (+)ssRNA, estas se replican formando dsRNA. RV no empaquetaría los segmentos (+)ssRNA en una cápsida preformada sino que estos formarían complejos con las proteínas VP1 y VP3 que serían encapsidados durante el ensamblaje del *core* viral con la ayuda de otras proteínas no estructurales (Borodavka et al., 2018). El volumen interno de la vDLP sería más que suficiente para estos segmentos (+)ssRNA. En este contexto, podríamos hipotetizar que la estructura de la vDLP se corresponde a la de una procápsida y que su expansión es concomitante a la replicación del (+)ssRNA a dsRNA. Sin embargo, hacen falta estudios complementarios, como la caracterización estructural de vDLP que contengan VP1 y VP3, para validar esta hipótesis.

Por otro lado, el mapa de densidad de la vDLP muestra una resolución significativamente menor en los trímeros P y P' de VP6 (Fig. 25B), con una ocupancia de solo el 62.5% respecto a la de los trímeros T de VP6 y la capa interna de VP2. La resolución local de la DLP es homogénea en el conjunto de la partícula, no observándose ninguna disminución de la densidad ni resolución local en los trímeros P y P' de VP6 (Fig. 25A). Esta disminución en la resolución de los trímeros pentaméricos ha sido previamente observada en un estudio comparativo entre la cepa de RV bovino, UK, y la cepa RV humana, Wa (Greig et al., 2006). Este estudio mostró que la cepa Wa poseía una ocupación menor del 10% en los trímeros de VP6 de las posiciones que rodean los ejes de simetría 5 (trímeros P), respecto al resto de trímeros de VP6. Estos trímeros P podrían encontrarse desestabilizados y/o ausentes en la mayoría de las partículas como resultado de una menor interacción con la capa VP2 subyacente o con los trímeros de VP6 vecinos (McClain et al., 2010). De hecho, el valor calculado para el parámetro *B-factor*, asociado a la resolución del modelo y que presenta mayores valores cuando la resolución del modelo es más baja, de VP6 es más bajo en los trímeros VP6-T y aumenta en las posiciones

pentaméricas de la partícula (McClain et al., 2010) formando un gradiente en los valores de *B-factor* obtenidos alrededor de estas posiciones similar al encontrado en partículas de BTV (Grimes et al., 1999). El contacto más íntimo se produce en el trímero T, con tres contactos idénticos bucle  $\beta 2-\alpha 3$  (residuos 64-72) de VP6 y la superficie externa de VP2 y, por lo tanto, podemos esperar que sea el que esté conectado con mayor firmeza. El resto de trímeros se unen con un menor número de contactos (McClain et al., 2010). Aunque no se encontraron diferencias significativas en los contactos observados entre VP2 y VP6 en la DLP y vDLP, ni variaciones significativas en la curvatura de la estructura de la cápsida generada por la interacción de los distintos monómeros de VP2, se observó un mayor número de interacciones entre los trímeros T de VP6 con VP2 en ambas cápsidas. El bajo número de contactos de los trímeros VP6 con VP2 en la estructura de la DLP se ha relacionado con su papel funcional en el proceso de transcripción durante la infección. La ausencia de VP7 llevaría a una dilatación de los canales pentaméricos de las partículas que permitirían el paso de nucleótidos, iones y cadenas de RNA transcritas (Aiyegbo et al., 2013; J. Z. Chen et al., 2009), así como la activación de la polimerasa de RV por el movimiento transmitido desde VP6 hacia el decámero de VP2 subyacente a la VP1. La dilatación de los canales pentaméricos debido a la ausencia de la capa de VP7, junto con la ausencia de la proteína VP1 acoplada a la cara interna de VP2 (Jenni et al., 2019; Lu et al., 2008) podría promover el desacoplamiento de los trímeros P de VP6 en la vDLP.

Una vez comprobado que las vDLP de RVA obtenidas mediante un sistema de expresión de proteínas heterólogo son un buen modelo para el estudio estructural de las DLP naturales, el siguiente objetivo fue extender ese análisis a las diferentes especies que forman el género rotavirus. Elegimos secuencias representativas de cada especie las secuencias de referencia de la base de datos Genome del NCBI. Esta es una decisión arbitraria, aunque motivada porque estas estirpes están entre las mejor caracterizadas de cada grupo y se conoce la secuencia completa de su genoma (con la excepción del grupo E, para el que no hay ningún genoma secuenciado). Como sistema de expresión heterólogo hemos empleado el sistema BEVS ya que, a pesar de la existencia de otros sistemas de expresión para la producción de VLP de RVA (Changotra & Vij, 2017), el sistema BEVS es el más empleado y el mejor caracterizado para esta labor (Palomares & Ramírez, 2009). Nuestro primer objetivo fue verificar la producción de vDLP de las estirpes de referencia mediante la coexpresión de las proteínas VP2 y VP6 a partir de baculovirus duales. La producción de vDLP resulta clave para la caracterización de la estructura de la partícula completa ya que las vDLP son un paso imprescindible para la generación de vTLP en el sistema BEVS. Por otro lado, se ha demostrado que es posible la generación *in vitro* de TLP de forma muy eficiente, empleando DLP junto con proteínas VP4 y VP7 purificadas, en las que el ensamblaje de la capa externa (VP7+VP4) refleja fielmente la estructura de la partícula natural (Herrmann et al., 2021). El empleo de un único virus para la coexpresión de las dos proteínas que forman la vDLP nos permitió utilizar multiplicidades de infección bajas (0.3 ufp/célula), aprovechándonos de la capacidad de replicación de los baculovirus y de la estabilidad de las vDLP en el sobrenadante de cultivo. Además,

esta estrategia evita la complicación de determinar la combinación ideal de multiplicidades de infección que maximiza la expresión de las dos proteínas, algo que no siempre es fácilmente predecible en este sistema (Mena et al., 2007). En todos los casos, el análisis mediante SDS-PAGE de extractos de células de insecto infectadas con los baculovirus duales mostró la presencia de bandas correspondientes a la sobre expresión de las proteínas recombinantes VP2 y VP6. En este punto, es importante señalar la gran diferencia que existe entre el proceso de morfogénesis durante la infección natural de RVA, y presumiblemente del resto de las especies, y el ensamblaje producido en un sistema heterólogo. La formación de partículas TLP durante la infección es un proceso altamente organizado, donde los diferentes componentes de la partícula viral se encuentran compartimentalizados (VP2 en los viroplasmos, VP6 en su periferia, VP4 asociada al RE, y VP7 insertada en la membrana del RE), haciendo que el proceso de ensamblaje ocurra de una forma progresiva y regulada por procesos virales en los que tienen un papel muy relevante las proteínas virales no estructurales (NSP2/NSP5 como organizadoras de los viroplasmos y NSP4 como principal elemento en la formación de las MEP, que median la incorporación de VP4 y VP7). En contraste, el ensamblaje en los sistemas heterólogos es un proceso muy poco caracterizado (Palomares & Ramírez, 2009) que parece ocurrir por la mera interacción entre las proteínas estructurales dispersas en el citoplasma.

Es esperable que el ensamblaje producido en sistemas de expresión heterólogos, en los que, por definición, los procesos virales no han evolucionado, y no se cuenta con las proteínas no estructurales implicadas en el ciclo de replicación, puedan ocurrir interacciones inespecíficas entre las proteínas recombinantes y las proteínas celulares que deriven en interferencias en los procesos de ensamblaje. Alternativamente, es posible que diferentes especies de rotavirus difieran en su dependencia de proteínas accesorias, virales o celulares, para dirigir el ensamblaje, y en su ausencia, éste desemboque en la formación de estructuras aberrantes. Probablemente, por una combinación de estas razones, no encontramos una correlación entre la cantidad de proteína expresada, su estequiometría, y la cantidad de vDLP ensambladas. Los casos más extremos son el caso de RVD, donde se producen gran cantidad de vDLP, a pesar de la relativamente baja expresión de las proteínas VP2 y VP6, y el caso de RVH, cuyas proteínas se expresan de forma muy eficiente, y en una estequiometría similar a la de la partícula viral, y apenas se detectan vDLP, produciéndose en su lugar una gran cantidad de estructuras tubulares, probablemente formadas por VP6.

En los casos en los que el ensamblaje progresa correctamente hasta la formación de vDLP, como ocurre en RVA, RVD, RVI y RVG, las partículas producidas son liberadas al medio extracelular de forma proporcional a la cantidad detectada intracelularmente en los estudios mediante microscopía electrónica de cortes ultrafinos (Fig. 31, 32). Cuando el ensamblaje no procede correctamente se detectan en general dos tipos de estructuras aberrantes, estructuras tubulares, características de la sobreexpresión de la proteína VP6, y estructuras electrodensas compactas, reminiscentes de los agregados de vSLP formados por la sobreexpresión de VP2 (Mena et al., 2006) (Fig. 30, 31, 32). La liberación de las partículas al

medio extracelular, probablemente debida a la lisis celular, es una importante característica del sistema BEVS, ya que la extracción de las partículas de las células infectadas mediante detergentes o solventes como el Vertrel XF afecta de forma significativa a su preservación estructural.

En las condiciones en las que hemos trabajado, el sistema BEVS produce de forma eficiente, como para abordar su caracterización estructural mediante criME, vDLP de las especies RVA, RVD, RVG y RVI. Las vDLP de RVG son producidas en menor cantidad y con una menor preservación estructural, ya que la mejor alternativa para su preparación es la extracción con Vertrel XF de extractos de células infectadas. Por esta razón, y por el tiempo disponible para la realización del presente trabajo, se eligió proceder solo con la caracterización estructural de las vDLP de las especies RVD y RVI. La expresión de las secuencias de VP2 y VP6 de las estirpes de referencia para las especies RVB, RVC, RVF y RVH ha producido cantidades muy limitadas de vDLP. En el caso de RVF se producen vDLP fácilmente detectables en los sobrenadantes de infección y en el interior de las células, pero en cantidades muy reducidas como para abordar su purificación. En el resto de las especies, la producción de vDLP es incluso más reducida. La falta de información sobre estas especies hace difícil predecir si el problema que hemos encontrado en su ensamblaje se debe a la secuencia concreta de la estirpe o a un problema relacionado con las características del ensamblaje de estas especies (como una mayor dependencia de las proteínas no estructurales para su ensamblaje, por ejemplo), que hagan inviable la estrategia de expresión que hemos empleado. Sin embargo, es probable que, en relación con la capacidad para la generación de ensamblados en el sistema BEVS, secuencias de distintas estirpes de una misma especie de rotavirus se comporten de forma diferente debido a diferencias en su estabilidad, o a diferentes interacciones artefactuales con los sistemas de expresión con los que no han evolucionado de forma conjunta. Esta es, probablemente, la razón por la que cuando se coexpresan en el sistema BEVS las proteínas VP2 de la estirpe ASP88 y VP6 de la de la estirpe S-1 de la especie C se produce el ensamblaje de vDLP (Clark K. B. et al., 2009), mientras que no ocurre así con la estirpe Bristol, la secuencia de referencia para la especie C que hemos elegido para este trabajo. En este caso, el empleo de secuencias de otras estirpes podría ser una solución para el aislamiento y caracterización de vDLP de estas especies. Alternativamente, otros sistemas de expresión heterólogos de características muy diferentes al sistema BEVS como levaduras o líneas celulares de mamíferos, en los cuales se ha demostrado la formación de VLP de RV (Laimbacher et al., 2012; Rodríguez-Limas et al., 2011) serían alternativas razonables para la generación de vDLP de estas especies.

### 5.3. Análisis y caracterización estructural de los modelos atómicos de vDLP de RVD y RVI

La coexpresión de VP2 y VP6 en el sistema BEVS ha permitido caracterizar mediante criME la estructura tridimensional de las vDLP de las especies RVD y RVI y construir un modelo atómico de las mismas. La diferencia más obvia entre estas vDLP y las de RVA es que las de RVD y RVI presentan un incremento de ~4% y ~10%, respectivamente, tanto en su radio interno como externo. Esto se traduce en un aumento del volumen interno del 14% para RVD ( $48 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$ ) y del 38% para RVI ( $58 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$ ).

Este incremento es llamativo si tenemos en cuenta que el tamaño del genoma empaquetado por RVD y RVI difiere mínimamente con el de RVA, siendo un 0,3% y 3,1% menor, respectivamente. Asimismo, las proteínas VP1 (125 kDa en RVD y 133 kDa en RVI) y VP3 (87 kDa en RVD y 81 kDa en RVI) no presentan un incremento significativo en su tamaño con respecto a las de RVA, en la que el tamaño de VP1 es de 125 kDa y el de VP3 de 87 kDa. Si consideramos un espaciamiento intercadenas de dsRNA similar al determinado experimentalmente para la DLP de RVA y restamos la contribución del volumen de VP1 y VP3, la ocupación del volumen interno de la cápsida por el genoma sería del 78% y del 64% para RVD y RVI, respectivamente. Estos valores son sustancialmente menores que el 91% de ocupación previamente determinado para la vDLP de RVA (tabla 11).

Especie	Genoma		Cápsida		Volumen (Å <sup>3</sup> )		Ocupación
	kpb	Volumen (Å <sup>3</sup> )	Radio interno (Å)	Volumen (Å <sup>3</sup> )	VP1	VP3	
DLP - RVA	18,5	34·10 <sup>6</sup>	230	51·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>5</sup>	1.6·10 <sup>5</sup>	75%
vDLP - RVA	18,5	34·10 <sup>6</sup>	215	42·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>5</sup>	1.6·10 <sup>5</sup>	91%
vDLP - RVD	18,5	34·10 <sup>6</sup>	225	48·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>5</sup>	1.6·10 <sup>5</sup>	78%
vDLP - RVI	18,0	33·10 <sup>6</sup>	240	58·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>5</sup>	1.6·10 <sup>5</sup>	64%

**Tabla 11. Volumen de la cápsida ocupado por los genomas y proteínas estructurales VP1 y VP3 de RVA, RVD y RVI.**

Se indican en la tabla el radio interno (Å) que mide cada una de la cápsidas y el volumen interno que presentan cada una de ellas. Se muestra el número de kpb y volumen (Å<sup>3</sup>) que ocuparían los genomas de la DLP de RVA y vDLP de RVA, RVD y RVI junto con los volúmenes de 12 copias de VP1 y VP3 que se encontrarían de forma ideal en el interior de la cápsida. Finalmente, se muestra el porcentaje respecto al volumen total de la cápsida que estaría ocupado por el genoma y las proteínas VP1 y VP3 en cada caso.

En el caso de RVA hemos determinado que se produce una expansión del volumen de la cápsida del 21% en la DLP con respecto a la vDLP, la cual reduce la ocupación del volumen interno de la cápsida al 75%. Hipotetizamos que esta expansión podría estar asociada a la replicación del genoma viral y sería necesaria para la funcionalidad de este. Aunque desconocemos si esta expansión ocurre también en RVD y RVI, ya que ambas cuentan con un genoma similar o menor al de RVA y el tamaño de sus cápsidas vDLP son mayores, por lo que en el caso de producirse esta expansión, haría que la ocupación en estas especies fuera todavía más baja.

Aunque el tamaño total del genoma entre las tres especies de RV es similar, las subunidades de VP2 de RVD y RVI tienen 31 y 100 residuos más que RVA, respectivamente. De estos, 21 y 58 aminoácidos, respectivamente, corresponden a una extensión N-terminal de VP2. En el caso de RVA los primeros residuos de VP2 (103 y 79 en el monómero A y B, en cada caso) no se resuelven. Para RVD y RVI estas regiones N-terminales no resueltas dan cuenta de 145/117 y 165/132 residuos en las cadenas A/B, respectivamente. Estos extremos se localizan hacia el interior de la cápsida, y si los consideramos como

una densidad promedio de  $1,8 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ , la ocupación del volumen interior de las vDLP ascendería a un 95, 83 y 67% para RVA, RVD y RVI, respectivamente. El análisis de la composición aminoacídica de estas regiones (Tabla 12) revela que, en todos los casos, hay un alto porcentaje de residuos cargados, tanto positiva como negativamente, siendo del 45.8, 48.6 y 37.1% para RVA, RVD y RVI, en cada caso. Sin embargo, mientras que para RVA y RVD el equilibrio entre esos residuos está ligeramente desplazado hacia la carga positiva (+1 para RVA y +2 para RVD), en RVI está desplazado hacia la carga negativa (-5). Si tenemos en cuenta que hay 120 copias de estos extremos N-terminal apuntando hacia el interior de la cápsida, el hecho de contar con unas 600 cargas negativas justificar la mayor ocupación del volumen interior de RVD y RVI con respecto a RVA.

		RVA		RVD		RVI	
		Número	%	Número	%	Número	%
Negativamente Cargados	Asp (D)	5	4.9	16	11.1	15	9.1
	Glu (E)	18	17.5	18	12.5	18	11.0
	<b>Total</b>	23	22.4	34	23.6	33	20.1
Positivamente Cargados	Arg (R)	5	4.9	6	4.2	4	2.4
	His (H)	1	1.0	0	0	4	2.4
	Lys (K)	18	17.5	30	20.8	20	12.2
	<b>Total</b>	24	23.4	36	25.0	28	17.0

**Tabla 12. Análisis de la carga del extremo N-terminal de VP2 de RVA, RVD y RVI.** Se indican en la tabla el número total de aminoácidos cargados encontrados en las regiones amino N-terminales no trazadas para RVA, RVD y RVI. En cada caso, se especifica el tipo, número y porcentaje que representa respecto al total, de los aminoácidos con carga negativa (D, E) y positiva (R, H, K) encontrados en dichos segmentos.

La comparación de los modelos atómicos de las especies analizadas muestra que, mientras que la estructura terciaria de VP2 y VP6 es prácticamente idéntica para RVA y RVD, en RVI hay una mayor divergencia estructural debido a la inserción de aminoácidos y modificación de elementos de estructura secundaria a lo largo de las moléculas. En las vDLP de RVD y RVI se conserva la conformación cuaternaria encontrada en RVA. Sin embargo, mientras que la estructura terciaria de la VP2 y VP6 entre RVA y RVD es semejante, encontrando solo diferencias estructurales en los bucles de contacto entre los diferentes monómeros de VP2 y en sus extremos amino (Fig. 33D) y ligeros cambios en VP6 localizados en el bucle lateral  $\beta 10-\beta 11$  y en bucle  $\alpha 6-\beta 15$ , las variaciones estructurales relacionadas con la estructura terciaria entre RVA y RVI se encuentran a lo largo de ambos monómeros (Fig. 35A-B, 37A-B). De forma paralela, el análisis de las secuencias de VP2 y VP6 muestra una mayor identidad (~37-48%) y similitud (~80%) entre RVA y RVD que entre RVA y RVI (12% de identidad, y ~65-70% de similitud) (Anexo 10-12). En colaboración con el grupo de investigación en gastroenteritis víricas (Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de

València), dirigido por el Profesor Javier Buesa, este análisis fue extendido a la caracterización de las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de RV (Anexo 13). De forma análoga a los estudios publicados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los árboles filogenéticos generados muestran la distribución de los diferentes grupos de RV en dos clados. Uno de ellos engloba los grupos RVA, C, D y G, mientras que el otro agrupa a RVB, F, H, I y J. Esto podría explicar la mayor similitud a nivel estructural entre RVA y RVD, al ser especies pertenecientes a un mismo clado y evolutivamente más cercanas, que entre RVA y RVI, que pertenecen a clados claramente diferenciados.

La única información estructural actualmente disponible para especies de RV diferentes a RVA es una predicción de la estructura de la partícula de RVC realizada por Eren y colaboradores (Eren et al., 2016), en la que la predicción del plegamiento de las estructuras secundarias de VP2 y VP6 es muy similar a las resueltas para RVA y RVD, lo que estaría relacionada con la pertenencia al mismo clado filogenético y menor distancia evolutiva. De esta forma, cabría esperar que las estructuras resueltas de RVA y RVD puedan representar una buena referencia para la predicción de la estructura de otros RV de su clado (RVA, C, D y G), así como la estructura de RVI para el suyo (RVB, F, H, I y J). La resolución de más estructuras de este segundo clado sería de gran utilidad para la realización de este tipo de predicciones estructurales de otras especies de RV no resueltas hasta ahora. Los resultados obtenidos sobre la caracterización estructural de las vDLP de RVA, D, e I suponen un excelente punto de partida para la futura caracterización estructural de pseudopartículas virales de triple capa, vTLP, de estos virus empleando el sistema BEVS o mediante el recubrimiento *in vitro* de las vDLP con proteínas VP4 y VP7 recombinantes purificadas (Trask & Dormitzer, 2006). Aunque se ha observado que el recubrimiento con VP4 no es muy eficiente en la formación de vTLP, tanto por la cantidad de trímeros de VP4 ensamblados como por la presencia de trímeros de VP4 erróneamente ensamblados, los métodos computacionales implementados en este trabajo podrían ayudarnos a determinar la estructura de las espículas de otros grupos de RV.

Además del estudio a nivel estructural, las VLP constituyen inmunógenos no infecciosos que no se replican por lo que resultan buenos candidatos para el desarrollo de vacunas. Las VLP son estructuralmente similares al virus original y por ello, una dosis más baja del antígeno es suficiente para provocar una respuesta inmune similar en comparación con las vacunas de subunidades (Noad & Roy, 2003). Además, pueden reducir el riesgo de efectos secundarios relacionados con las vacunas convencionales y permitirían diseñar e incluir serotipos emergentes en estas vacunas. Las vacunas basadas en VLP son más seguras y pueden inducir respuestas inmunes innatas y adaptativas (Changotra & Vij, 2017) (Kushnir et al., 2012) (Noad & Roy, 2003). Se ha demostrado que las VLP de RV inducen respuestas inmunitarias significativas mediante diferentes rutas de inmunización (intramuscular o intrarectal, intranasal, intraperitoneal, oral o parenteral) (Agnello et al., 2006) (O'Neal et al., 1997; Perez et al., 2006; Zhou et al., 2011). En este contexto, las VLPs representan una buena herramienta para el desarrollo de mejores y nuevas vacunas que brinden una mayor protección frente a las nuevas

cepas y especies que continúan apareciendo. Un reciente estudio desarrolló una vacuna combinada frente a la gastroenteritis aguda en niños que consiste en VLP de norovirus y proteína VP6 recombinante de RV, producida en mediante el sistema BEVS (Heinimäki et al., 2019).

Por otro lado, las VLPs pueden ser utilizadas como nanotransportadores para la administración de fármacos (Trugnan et al., 2010). Una ventaja de las VLP de RV como sistema de transporte es su capacidad para entrar en las células diana del tracto gastrointestinal. Las vTLP imitan los virus naturales y podrían usarse como un sistema de transporte para la administración de fármacos específicos en las células. La unión de proteínas en el extremo amino de VP2 no impide la formación de VLP y podría proteger las moléculas contenidas en su interior de la degradación y, en algunos casos, también mejorar su absorción. (Charpilienne et al., 2001).

Por último, aunque en este trabajo no fue posible llevar a cabo la purificación vDLP de los grupos B, C, F y H, la capacidad para purificar las proteínas recombinantes VP2 y/o VP6 a partir de células infectadas o del sobrenadante de infección, junto con la posibilidad de generar anticuerpos frente a ellas, permitiría el desarrollo de ensayos de diagnóstico sensibles y específicos para determinar la epidemiología y carga de enfermedad de cada grupo de RV. Aunque la técnica de PCR es una técnica empleada con frecuencia para la detección del virus, a menudo no sirve para el diagnóstico debido a la degradación de los ácidos nucleicos derivada del desensamblaje y/o la inestabilidad de las proteínas de la cápsida bajo ciertas condiciones.

## *Conclusiones*

---

1. La activación de la espícula mediante proteasas similares a tripsina se traduce en el corte de los bucles  $\alpha 3\text{-}\beta 14$  en los residuos R231, R241 y R247 así como en la pérdida del dominio lectina de la cadena C observado en las espícula sin activar.
2. La espícula no activada está bloqueada en su conformación debido a la posición de los dos bucles externos  $\alpha 3\text{-}\beta 14$  que flaquean y unen los dominios de la cabeza al cuerpo de la espícula. La proteólisis de estos bucles en la espícula activada rompe este bloqueo, libera el dominio lectina C y la hace competente para realizar los diferentes movimientos que a nivel molecular permiten penetración la membrana celular.
3. La pseudo DLP de RVA producida en células de insecto por la expresión de las proteínas VP2 y VP6 de la estirpe de rotavirus A de SA11 es un buen modelo estructural de la DLP natural. La pseudo DLP mostró una semejanza estructural muy alta con respecto a la DLP nativa tanto en su estructura terciaria como cuaternaria, mostrando únicamente un aumento del diámetro de unos 15 Å en la DLP, observado como una ligera expansión en los monómeros de VP2 y VP6.
4. La expresión en células de insecto mediante baculovirus recombinantes de las proteínas VP2 y VP6 de las estirpes de referencia para los rotavirus D, G e I produce pseudo DLP con una buena preservación estructural y en cantidades suficientes para abordar su caracterización estructural. Mientras que las pseudo DLP de RVD y RVI fueron purificadas del sobrenadante de infección, en el caso de RVG, las pseudo DLP se purificaron con mayor eficacia del interior células de insecto. Este proceso de purificación dificultó el proceso de obtención de grandes cantidades para su estudio por criome.
5. La comparación de la estructura de la pseudo DLP de los Rotavirus A, D, e I muestra una estructura cuaternaria similar entre ellas. Aunque todas mantienen una estructura común, las pseudo DLP de RVD y RVI presentan una expansión de unos 8 Å y 24 Å adicionales en su diámetro, respectivamente, probablemente relacionada con el mayor número de aminoácidos en la estructura de la VP2 de RVD y RVI con 31 y 100 aminoácidos adicionales, en cada caso. Se encontraron mínimas diferencias entre las estructuras terciarias de RVA y RVD, principalmente localizadas en bucles periféricos relacionados las interacciones de otros monómeros, en el caso de VP2, y bucles en las regiones externas de la estructura de VP6. Las diferencias encontradas con RVI fueron mucho más numerosas y se encontraron a lo largo de toda la cadena de VP2 y VP6.

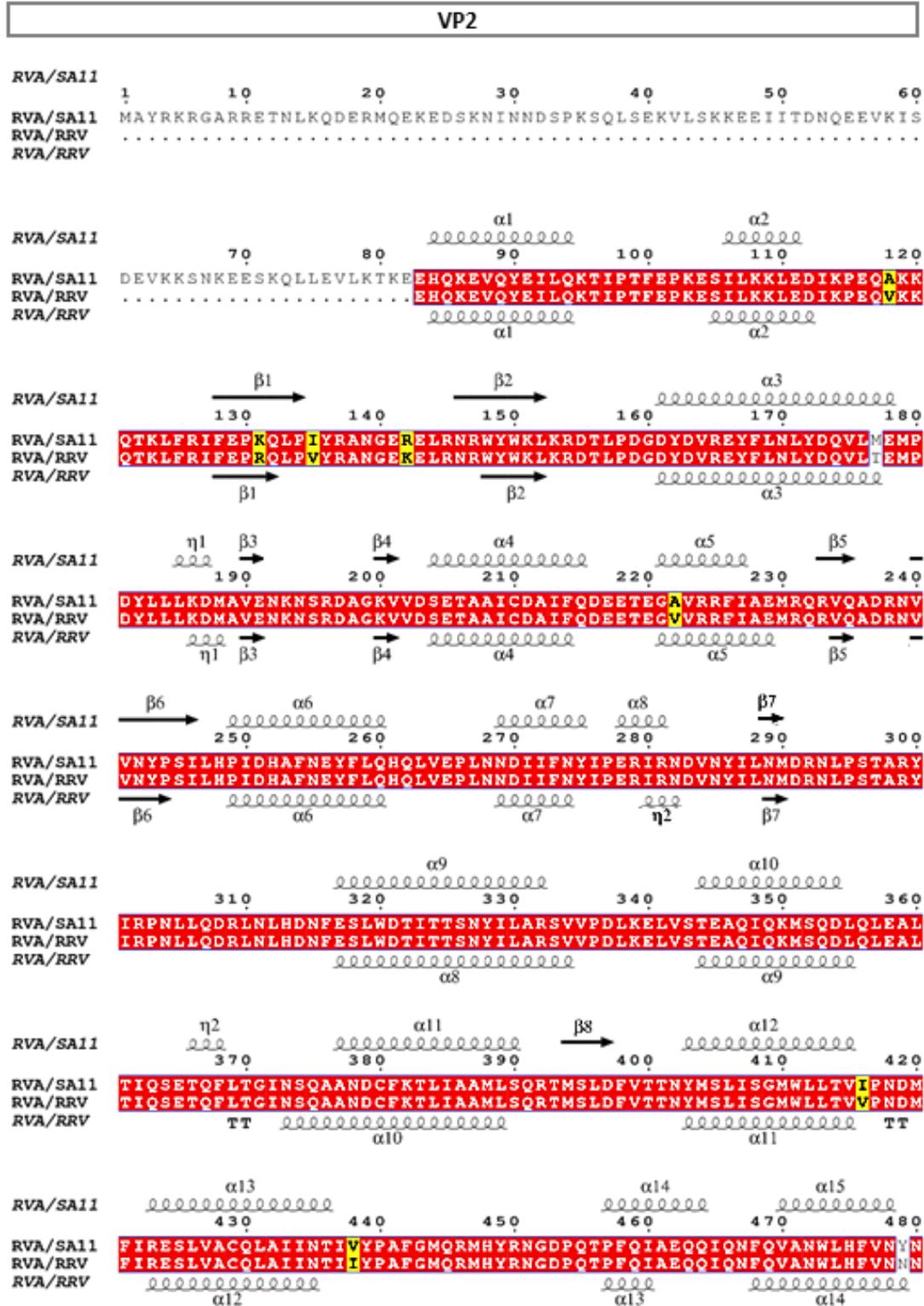
## *Anexos*

---

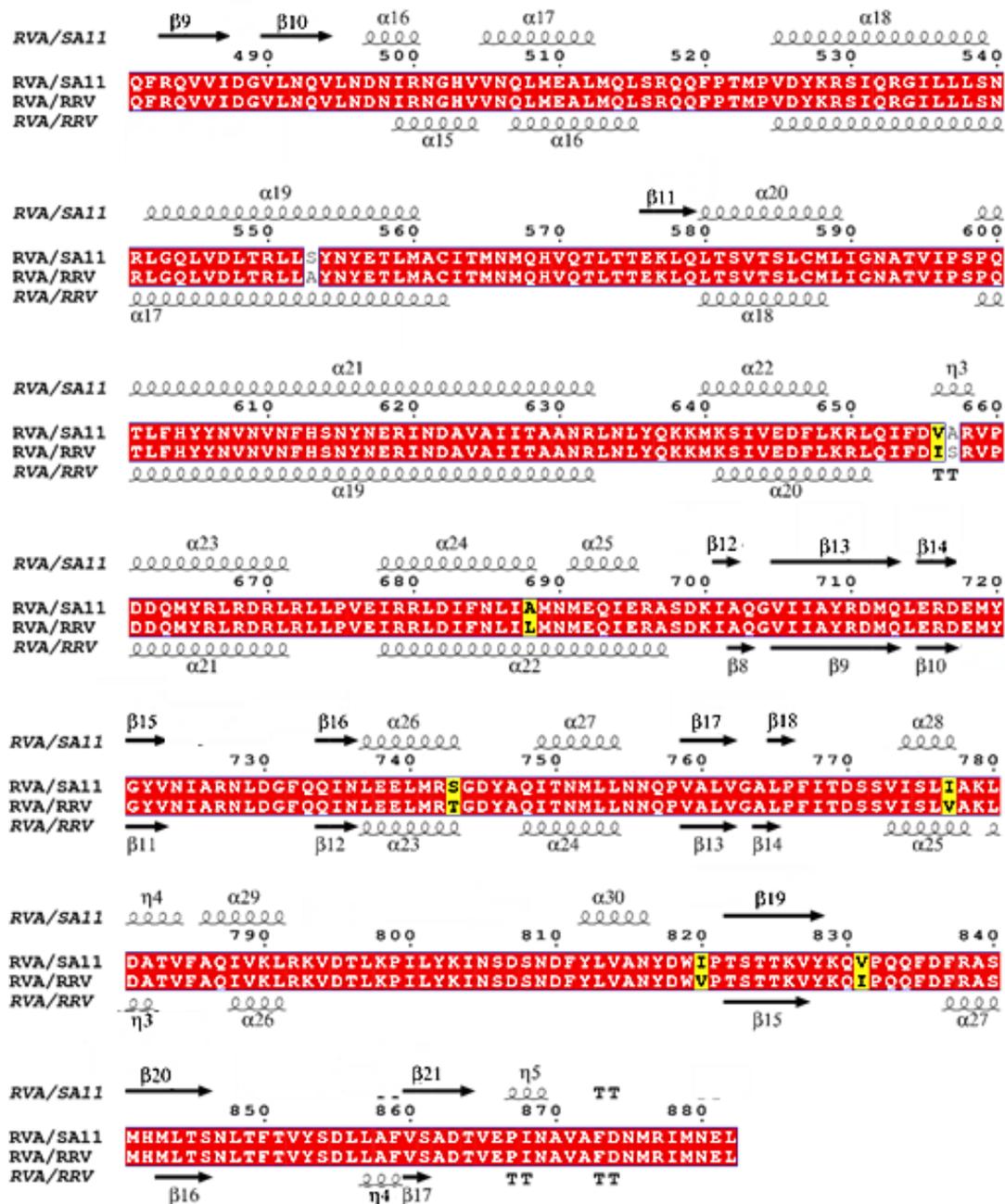
## Anexo1. Segmentos del genoma y productos proteicos de la cepa de simio SA11 de RVA

Segmentos genoma		Proteínas		Ubicación Moléculas en el virión por virión		Funciones	
Nombre	pb	Nombre	aa	kDa			
1	3302	VP1	1088	125.0	Core	12	RNA polimerasa dependiente de RNA, unión a ssRNA, formación de complejo con VP3, activada por VP2.
2	2687	VP2	881	102.4	Core	120	Proteína de la capa interna del virión, unión a RNA, necesaria para la actividad replicasa de VP1
3	2592	VP3	835	98.1	Core	12	Guanidiltransferasa, metiltransferasa, fosfodiesterasa, unión a ssRNA, complejo con VP1
4	2362	VP4	776	86.8	Capa más externa	180	Antígeno de neutralización P, formación de homotrimeros, unión a receptor celular, favorece la infectividad, factor de virulencia, fusión con membrana celular. Proteína sensible a proteasa
		VP5*	529	60.0	Capa más externa	180	Producto proteolítico de VP4: fusión con membrana celular y entrada
		VP8*	131	28.0	Capa más externa	180	Producto proteolítico de VP4: unión a carbohidratos en membrana celular
5	1611	NSP1	495	58.7	No estructural		Antagonista de interferón, ubiquitin ligasa E3 viral, unión a RNA
6	1356	VP6	397	44.8	Capa intermedia	780	Homotrímero, Antígeno específico de grupo y subgrupo, necesaria para la transcripción, proteína mayor del virión, proteína de la capa intermedia del virión
7	1074	NSP3	312	34.6	No estructural		Potenciador de traducción, unión al extremo 3' de (+) ssRNA, a eIF4G celular y a Hsp90, sustituye a la PABP celular, inhibe la traducción de proteínas del hospedador.
8	1059	NSP2	317	36.7	No estructural		Octámeros, unión a RNA, NTPasa, NDP quinasa, actividad desestabilizadora de la hélice de RNA, formación del viroplasma con VP1 y NSP5
9	1062	VP7	326	37.4	Capa más externa	780	Homotrímero, glicoproteína, antígeno de neutralización G, estabilizado por Ca <sup>2+</sup>
10	751	NSP4	175	20.3	No estructural		Glicoproteína transmembrana del RER, receptor intracelular de DLPs, interacción con viroplasma, modula los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular y replicación de RNA, enterotoxina (secretada), factor de virulencia
11	666	NSP5	198	21.7	No estructural		Dímero, proteína fosfo- y O-glicosilada, unión a RNA, quinasa, formación del viroplasma con NSP2, interacción con VP2 y NSP6
		NSP6	92	12	No estructural		En RVA/SA11, se fosforila, e interacciona con NSP5 localizada en viroplasma, unión a RNA

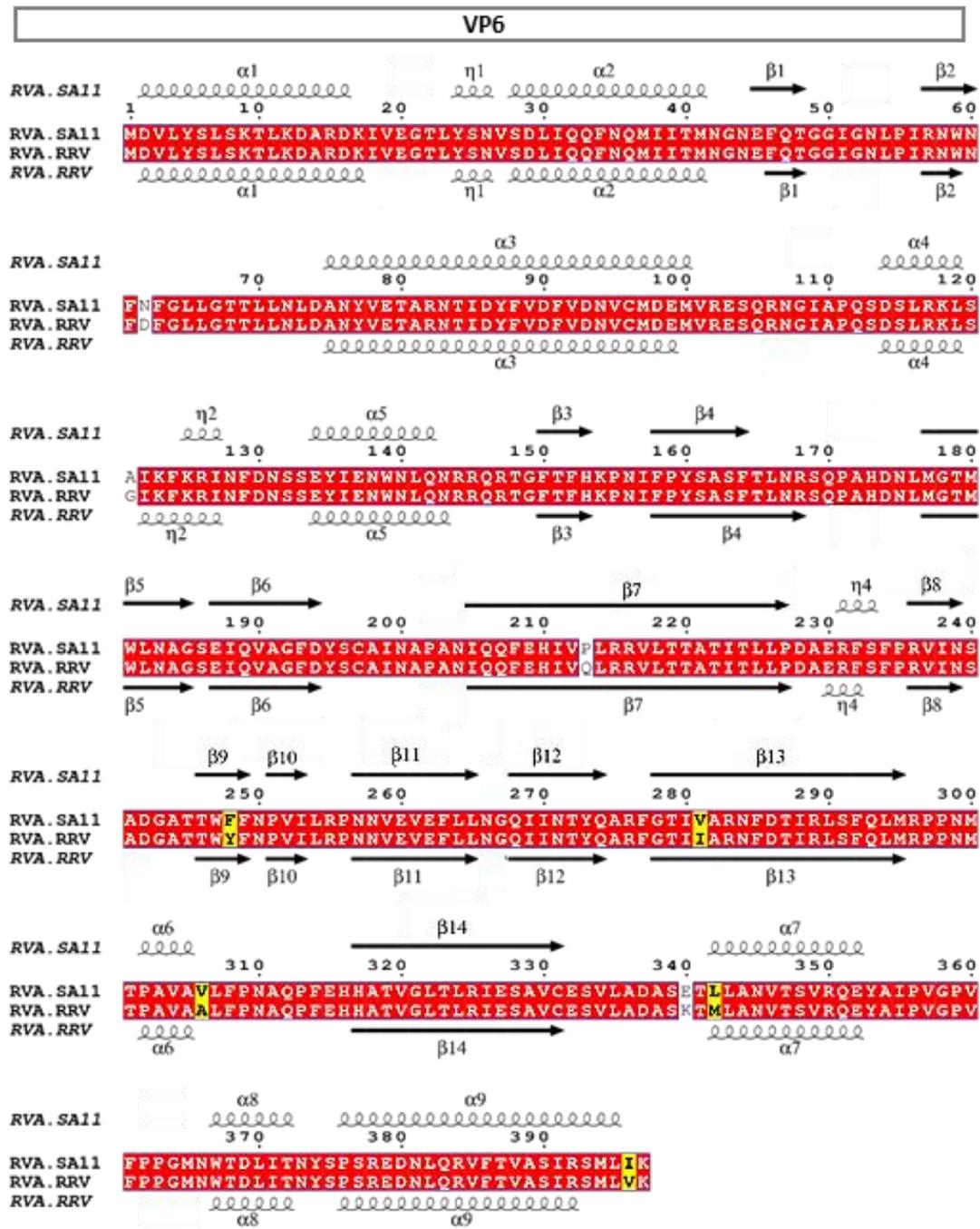
Anexo 2. Alineamientos de las secuencias de las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7 de las cepas de simio SA11 y RRV de RVA. Realizados empleando del programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Las ilustraciones han sido generadas empleando el programa EsPript (Robert & Gouet, 2014). Los elementos de estructura secundaria se representan mediante espirales, en el caso de  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ ,  $\eta$ ) y flechas en el caso de láminas- $\beta$ . Los residuos idénticos se indican en fondo rojo y residuos similares se indican en fondo amarillo.



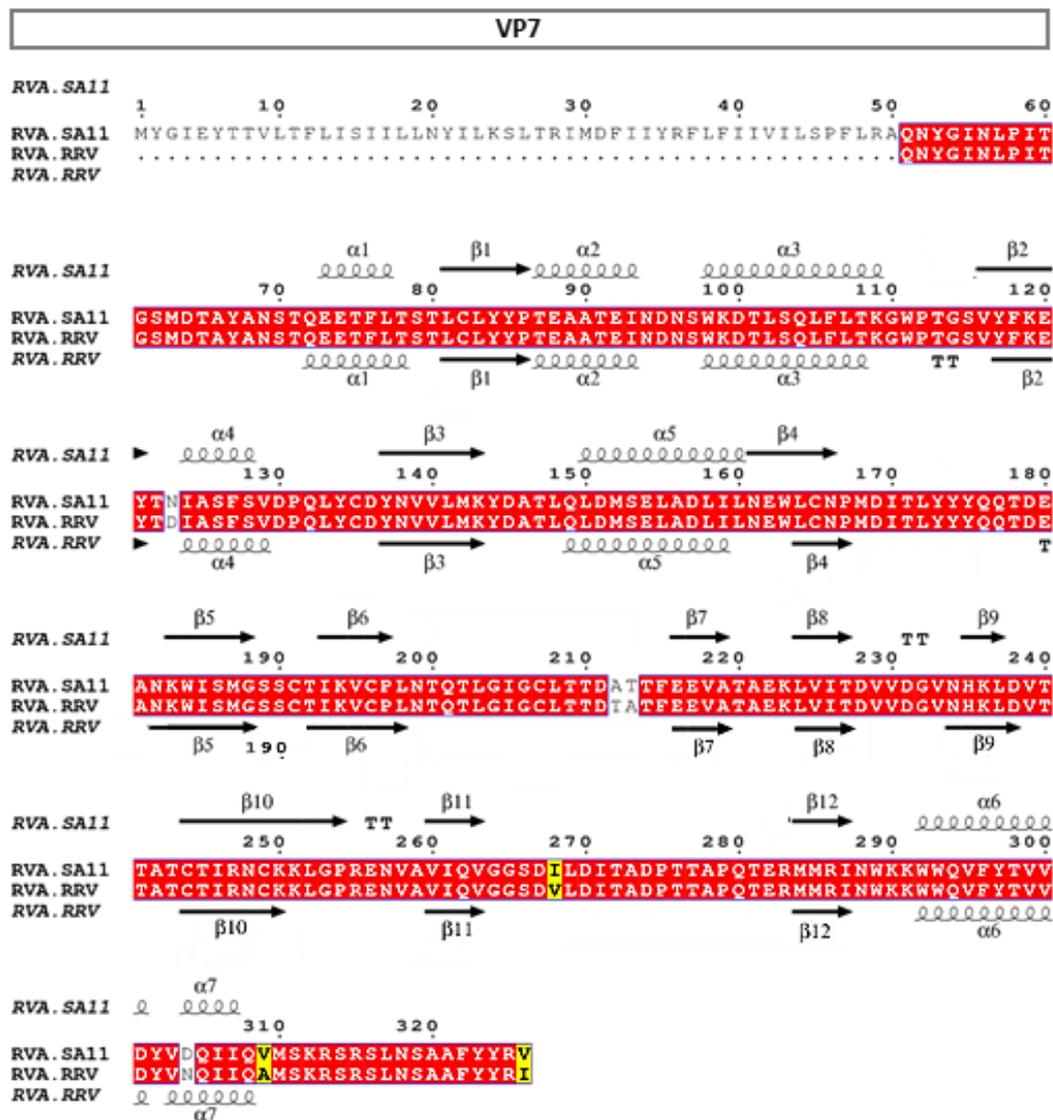
Anexo 2. Alineamientos de las secuencias de las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7 de las cepas de simio SA11 y RRV de RVA. (Continuación)



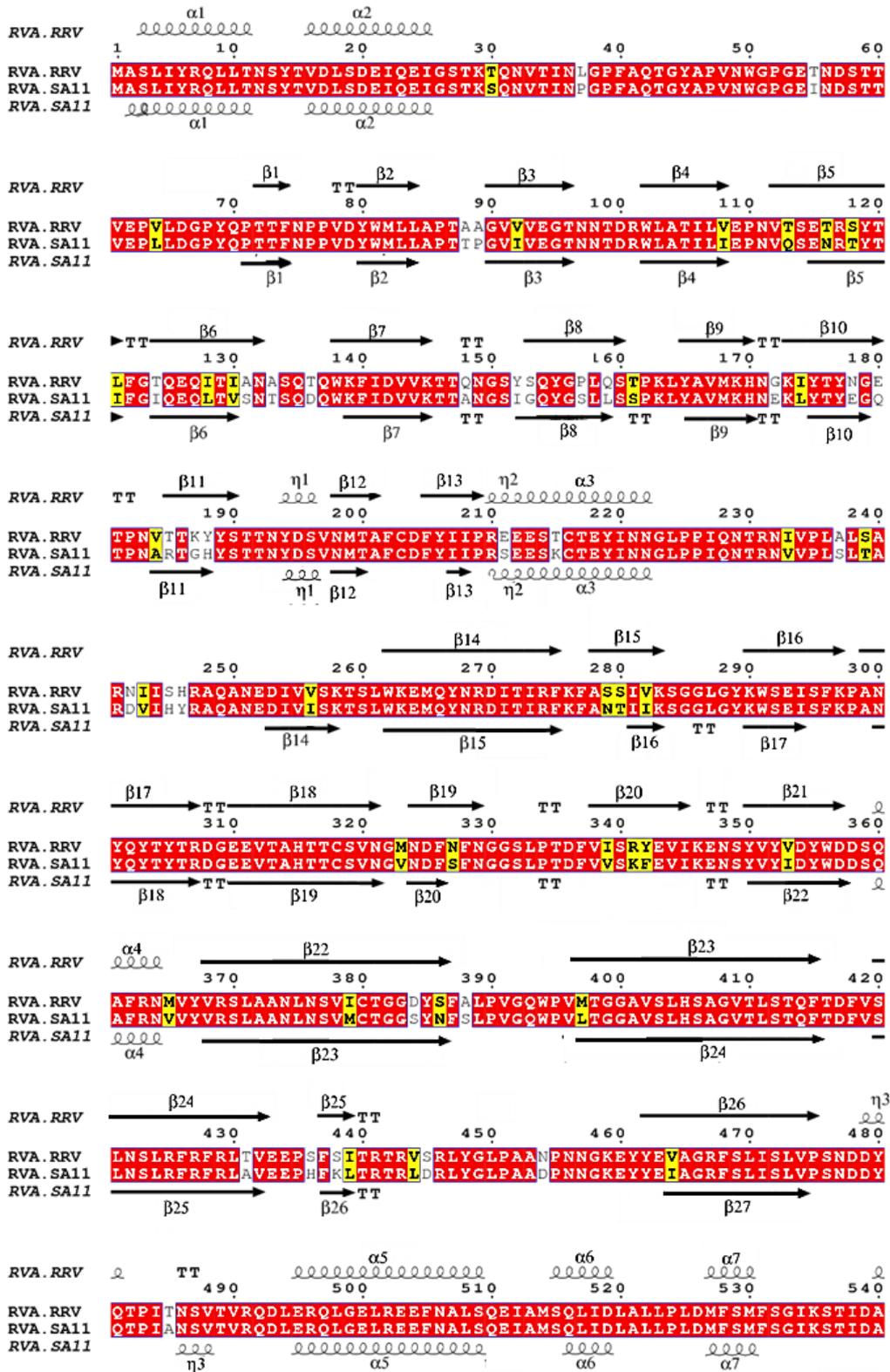
Anexo 2. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7 de las cepas de simio SA11 y RRV de RVA. (Continuación)



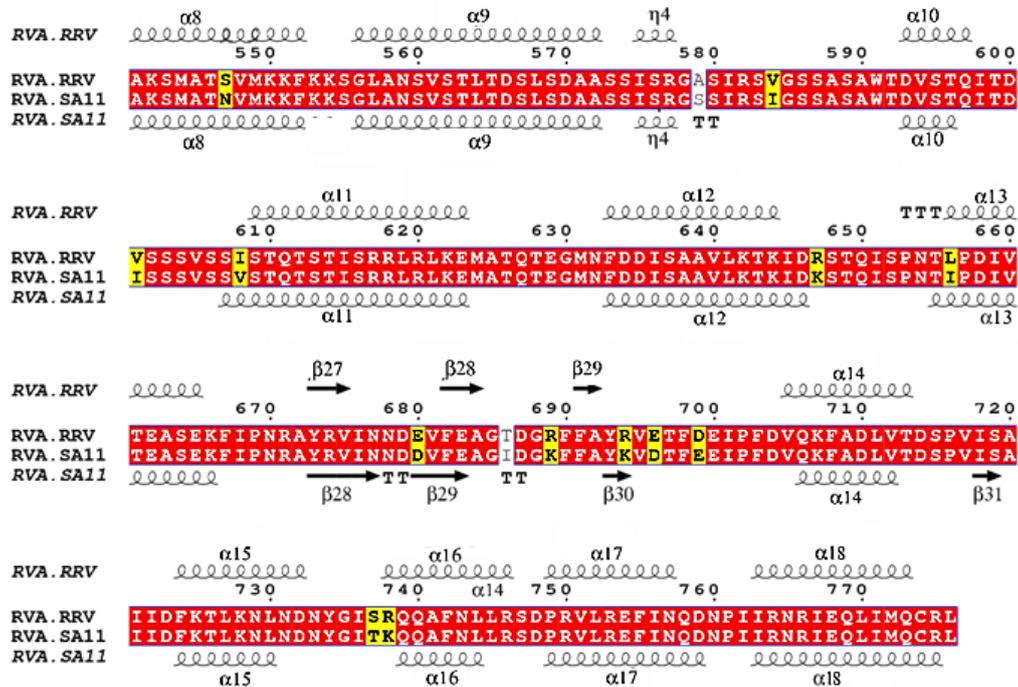
Anexo 2. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7 de las cepas de simio SA11 y RRV de RVA. (Continuación)



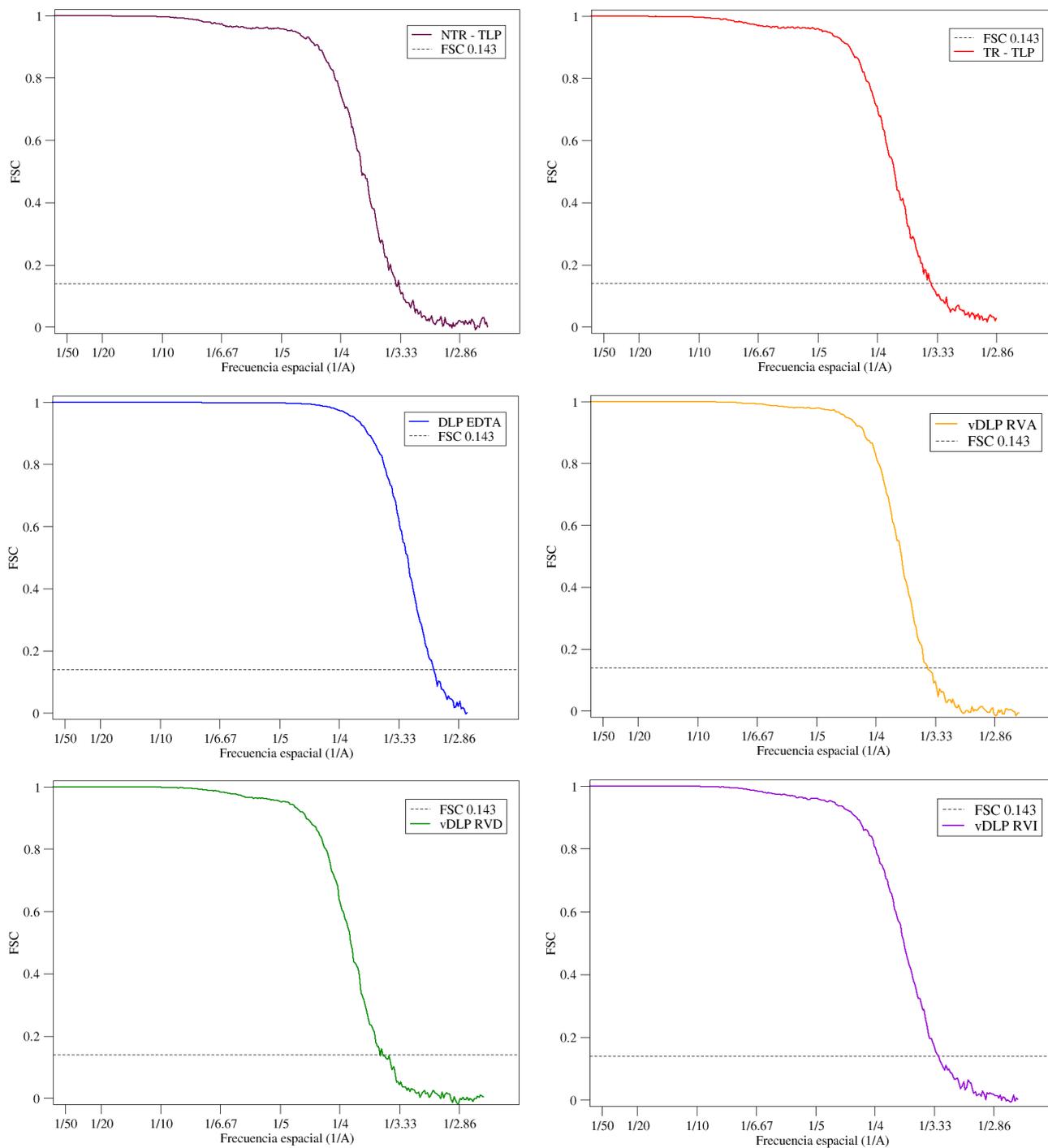
**Anexo 3. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP4 de la cepas de simio SA11 y RRV de RVA.** Realizados empleando del programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Las ilustraciones han sido generadas empleando el programa EsPrint (Robert & Gouet, 2014). Los elementos de estructura secundaria se representan mediante espirales, en el caso de  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ ,  $\eta$ ) y flechas en el caso de láminas- $\beta$ . Los residuos idénticos se indican en fondo rojo y residuos similares se indican en fondo amarillo.



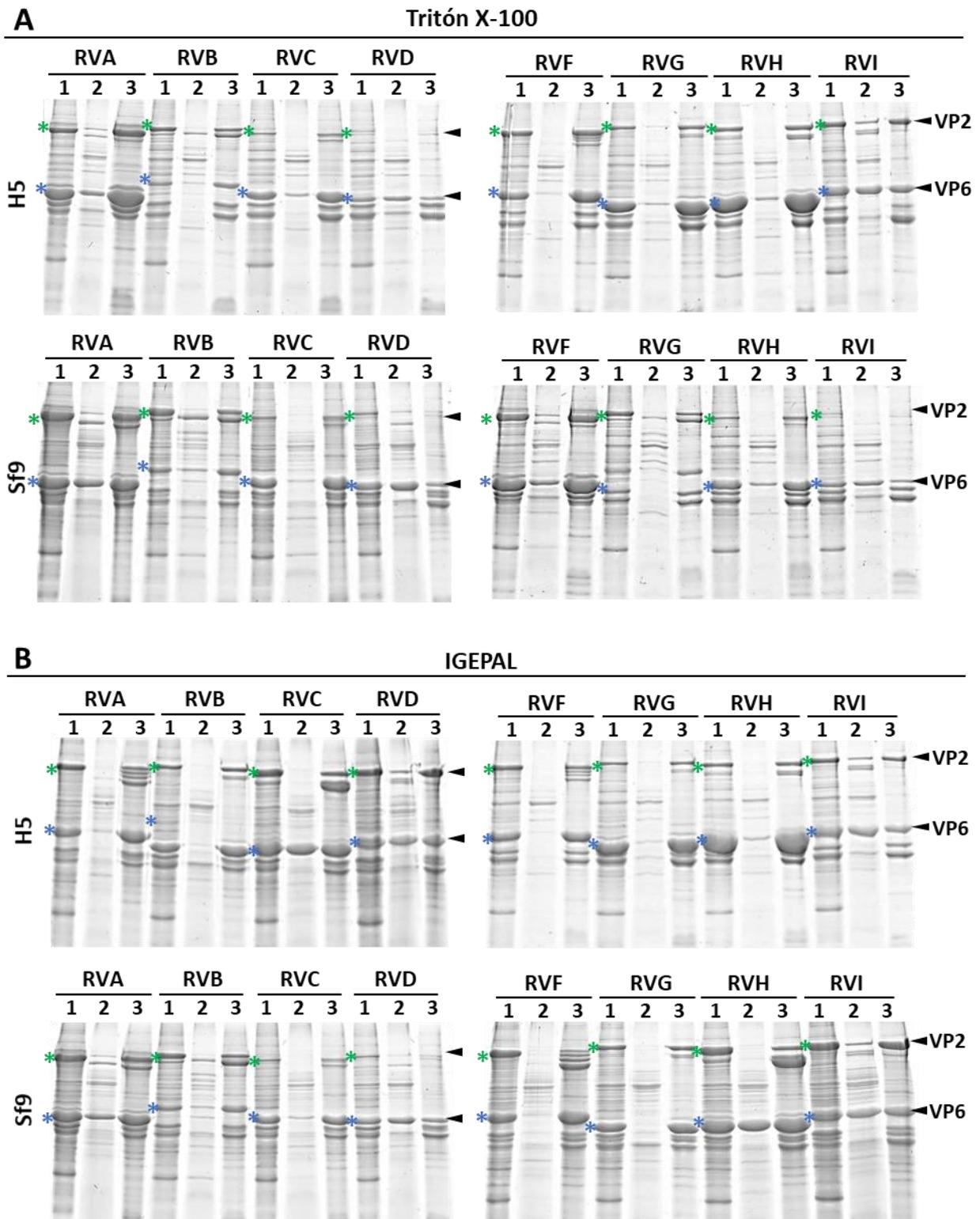
Anexo 3. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP4 de la cepas de simio SA11 y RRV de RVA. (Continuación)



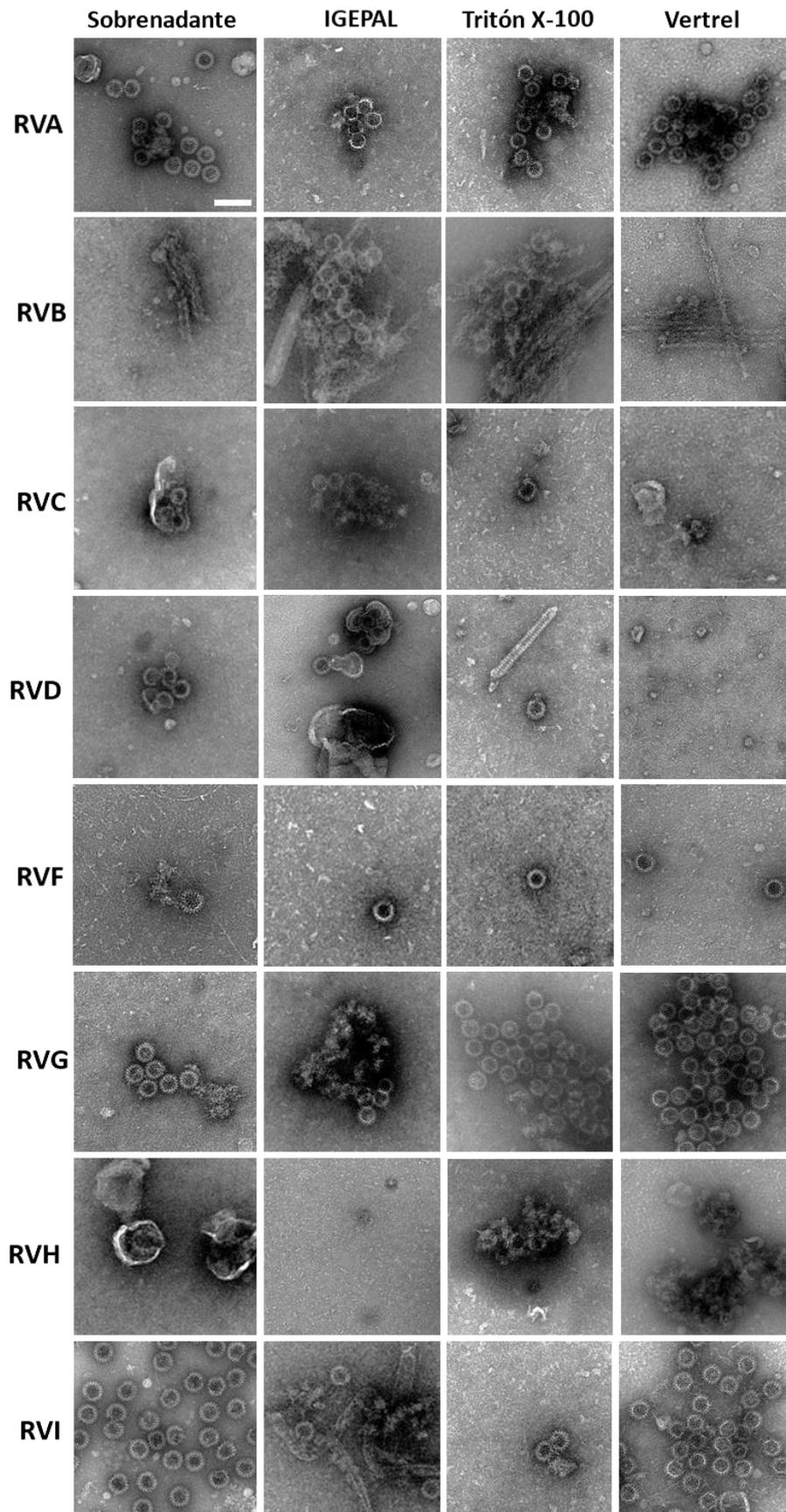
**Anexo 4. Resolución global de los modelos atómicos de la NTR-TLP, TR-TLP y DLP de SA11 y vDLP de RVA, RVD y RVI.** Se muestran las curvas de resolución (FSC) en cada caso. Se indican los valores de resolución de 3.40 Å, 3.48 Å, 3.04 Å, 3.42 Å, 3.53 Å y 3.31 Å basados en el criterio FSC a 0.143, de la NTR-TLP, TR-TLP y DLP de SA11 y vDLP de RVA, RVD y RVI, respectivamente.



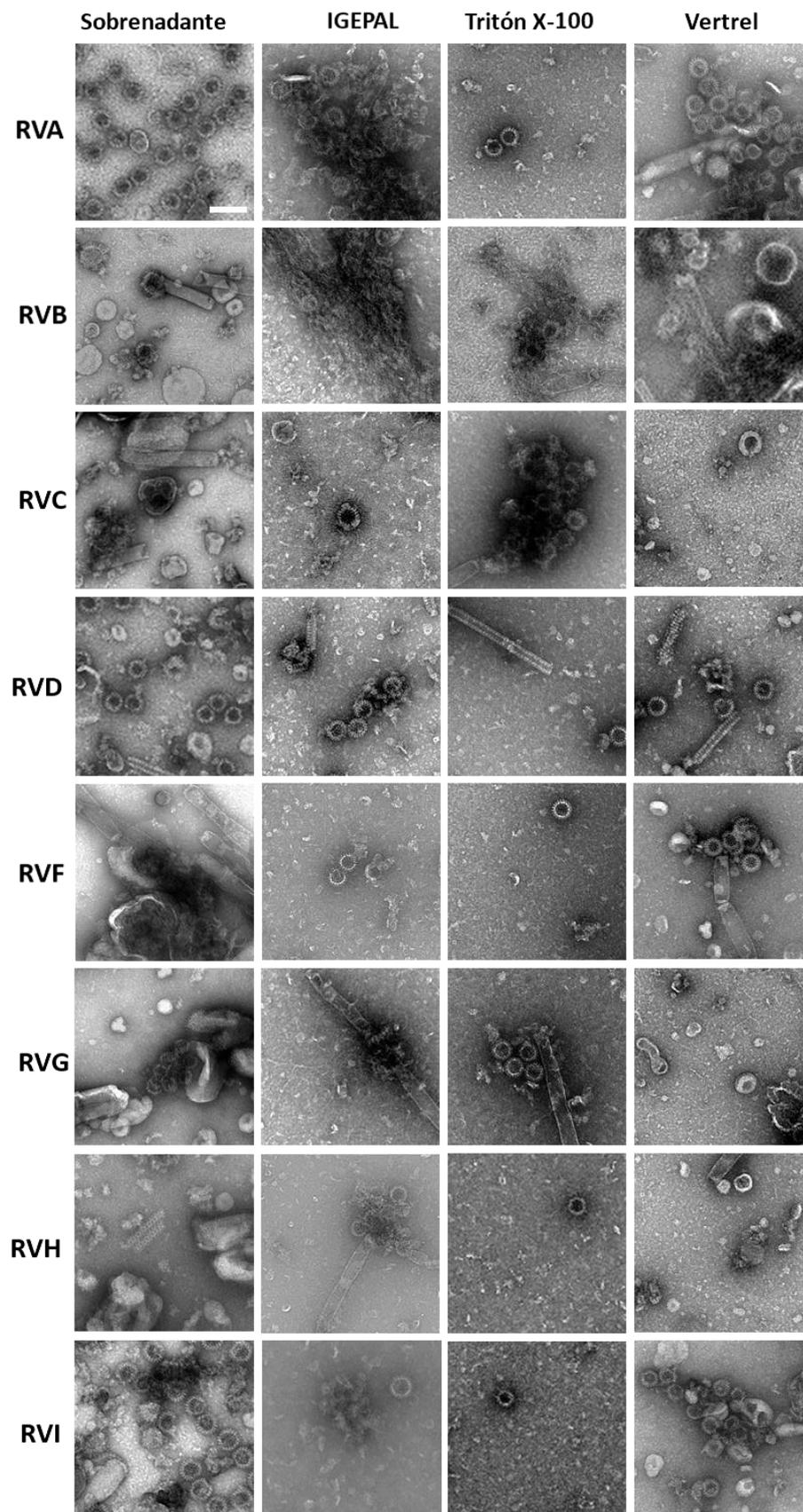
**Anexo 5. Análisis bioquímico de los extractos celulares tratados con detergentes.** Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de los extractos celulares totales (carril 1), fases solubles (carril 2) y fases insolubles (carril 3) tras el tratamiento los detergentes Tritón X-100 (panel A) e IGEPAL (panel B) de células H5 y Sf9 infectadas con rBVs que expresan las proteínas estructurales VP2 y VP6 de los distintos grupos de RV indicados (RVA-RVI). Las puntas de flecha negras indican la posición general de las bandas correspondientes a VP2 y VP6, que se indica mas precisamente a la izquierda del carril correspondiente a los extractos totales de cada muestra con un asterisco de color verde en el caso de la banda correspondiente a la proteína VP2 y de color azul en el caso de VP6.



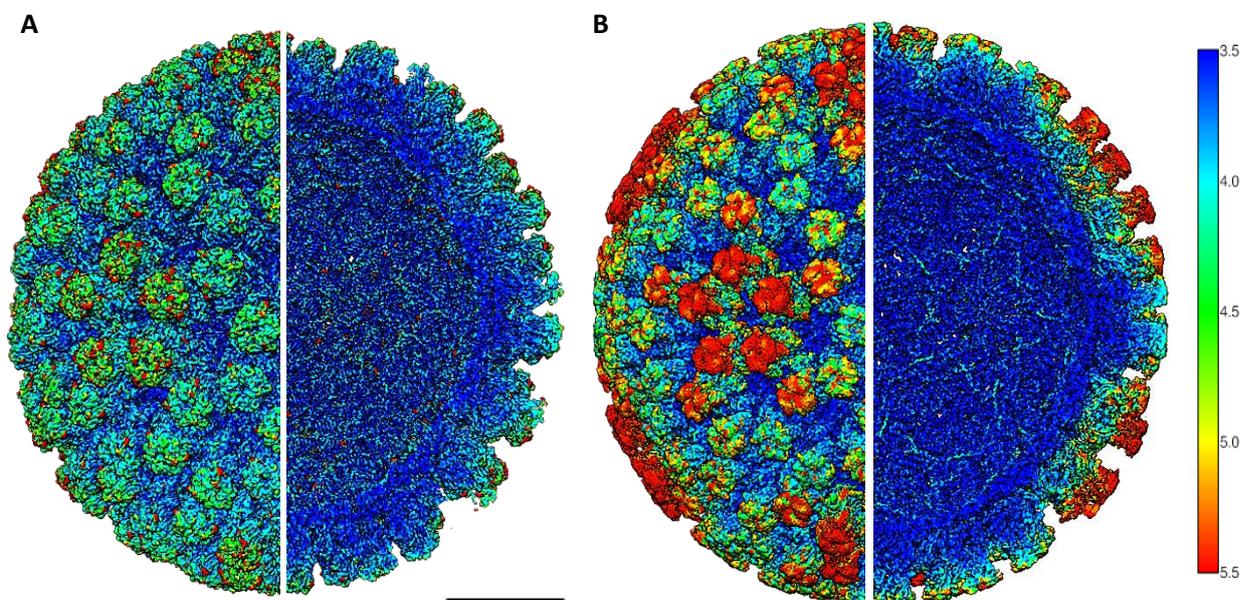
**Anexo 6. Análisis por microscopía electrónica por tinción negativa de ensamblados purificados del interior de células H5. Visualización del material ensamblado obtenido tras la infección con rBVs para la expresión de VP2 y VP6 de los grupos A-D F-I de RV. Se indica el grupo de RV correspondiente a cada imagen. Barra de escala a 200 nm.**



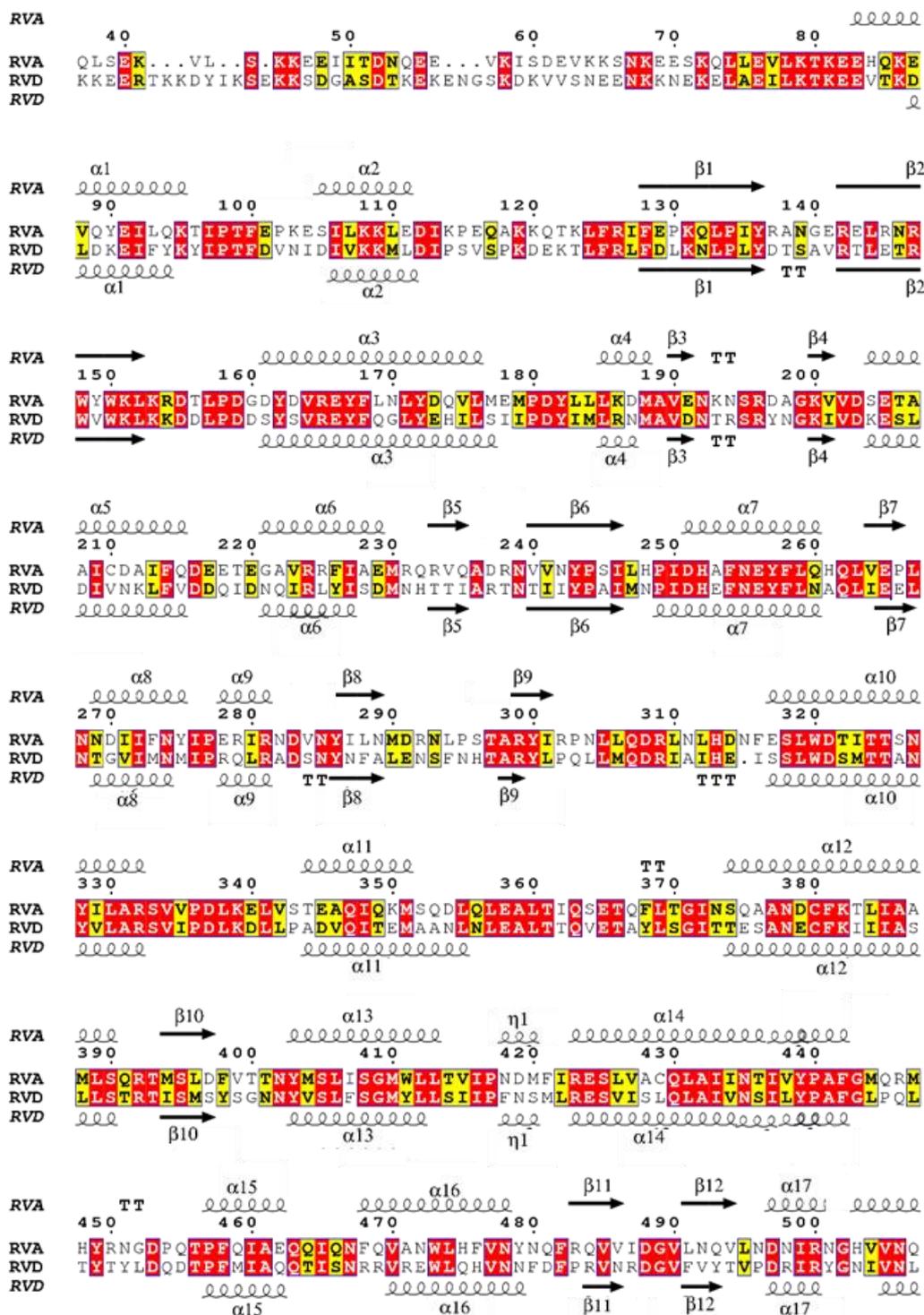
**Anexo 7. Análisis por microscopía electrónica por tinción negativa de ensamblados purificados del interior de células Sf9.** Visualización de imágenes de tinción negativa por ME del material ensamblado obtenido tras la infección con rBVs para la expresión de VP2 y VP6 de los grupos A-D F-I de RV. Se indica el grupo de RV correspondiente a cada imagen. Barra de escala a 200 nm.



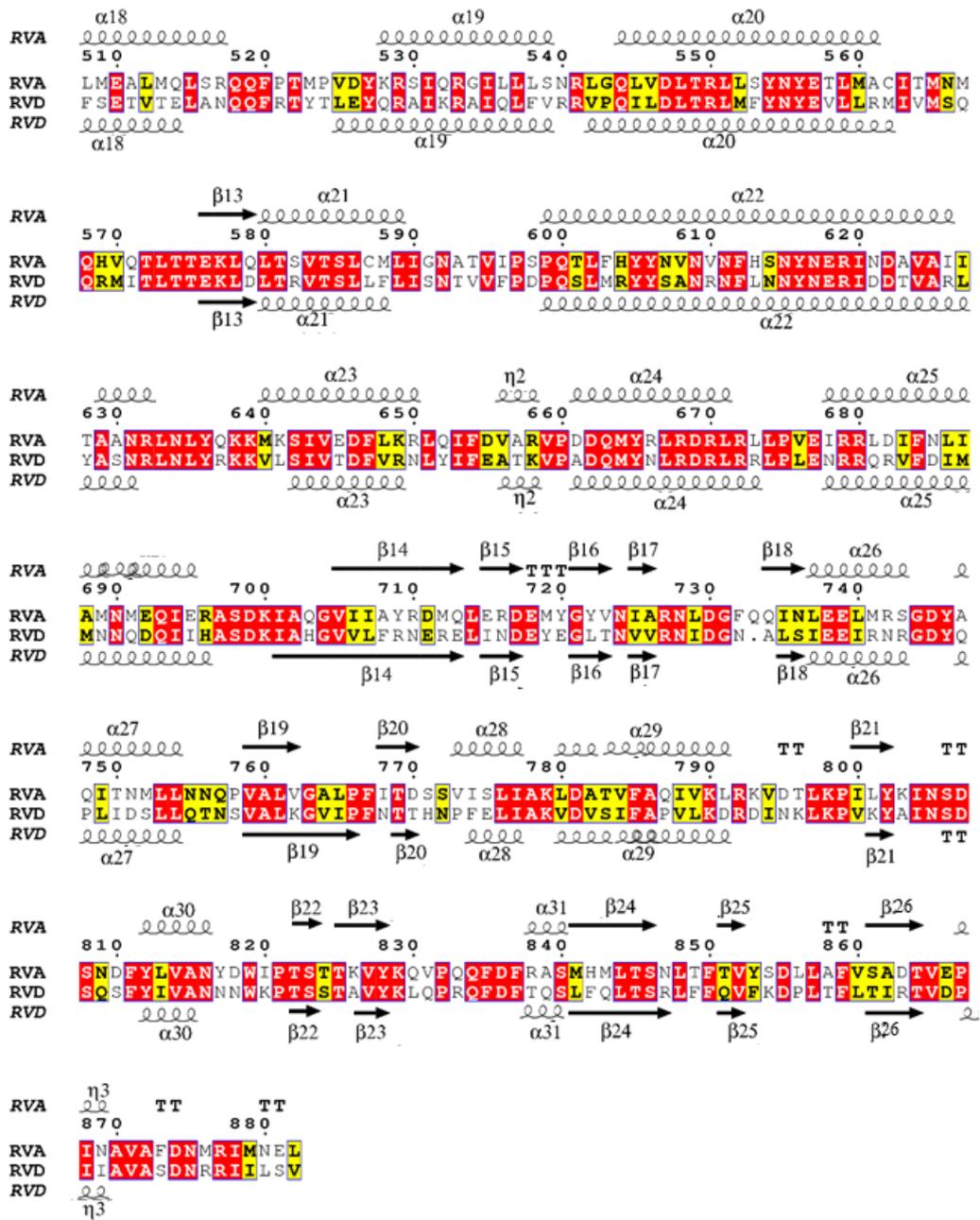
**Anexo 8. Análisis de la resolución local de los mapas 3D obtenidos de la vDLP de RVD y RVI.** Representación de los mapas 3D de la partícula vDLP de RVD (A) y RVI (B) vistos a lo largo del eje icosaédrico de simetría 2. Las superficies están coloreadas de acuerdo con la resolución local calculada para cada 3DR. Se muestra el código de color con las correspondientes resoluciones en Å. Las densidades se contornean a  $2\sigma$  por encima de la media. La barra de escala representa 100 Å.



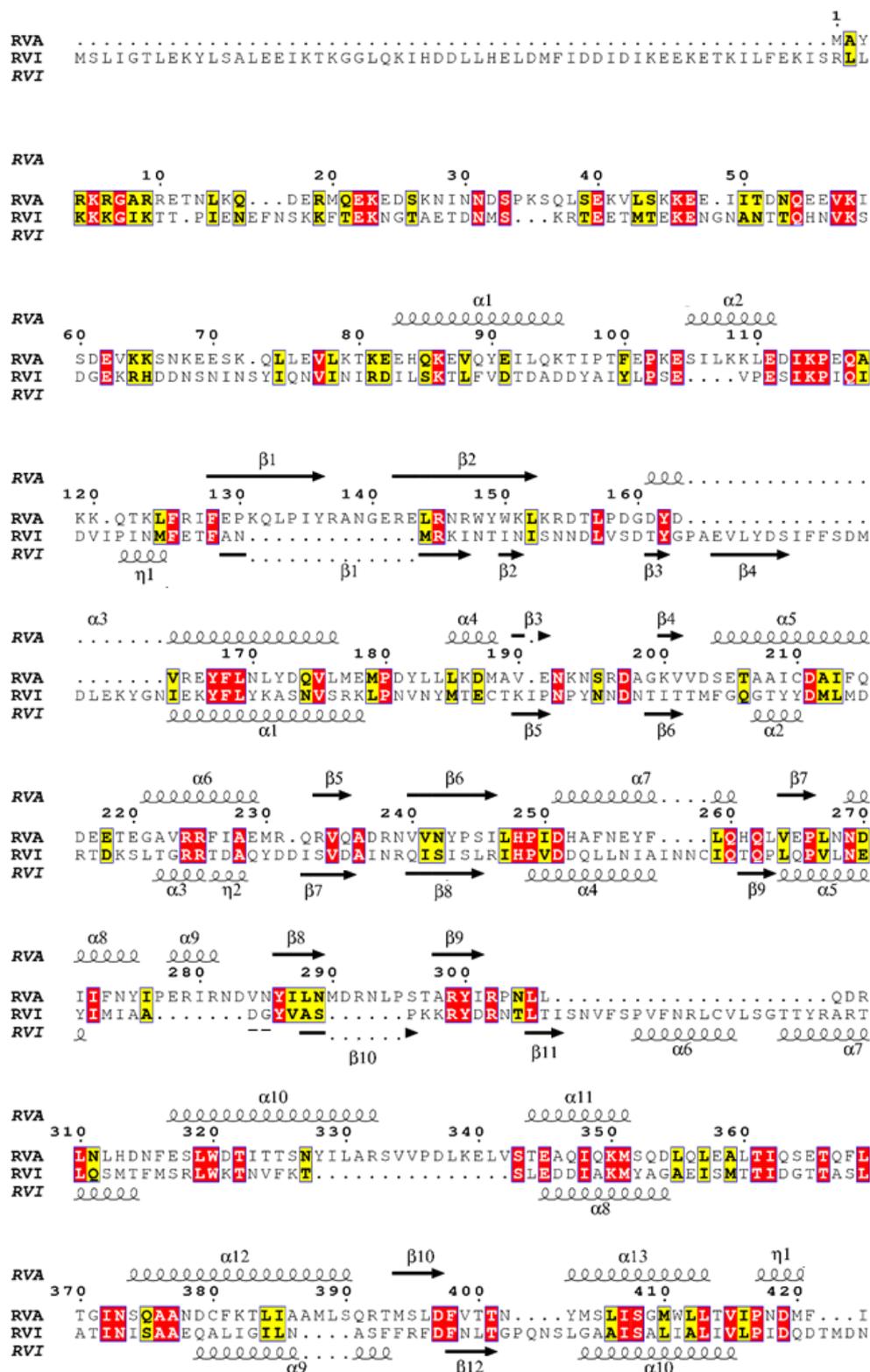
**Anexo 9. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2 de la cepa de referencia de RVA y RVD. Realizados empleando del programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Las ilustraciones han sido generadas empleando el programa EsPript (Robert & Gouet, 2014). Los elementos de estructura secundaria se representan mediante espirales, en el caso de  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ ,  $\eta$ ) y flechas en el caso de láminas- $\beta$ . Los residuos idénticos se indican en fondo rojo y residuos similares se indican en fondo amarillo.**



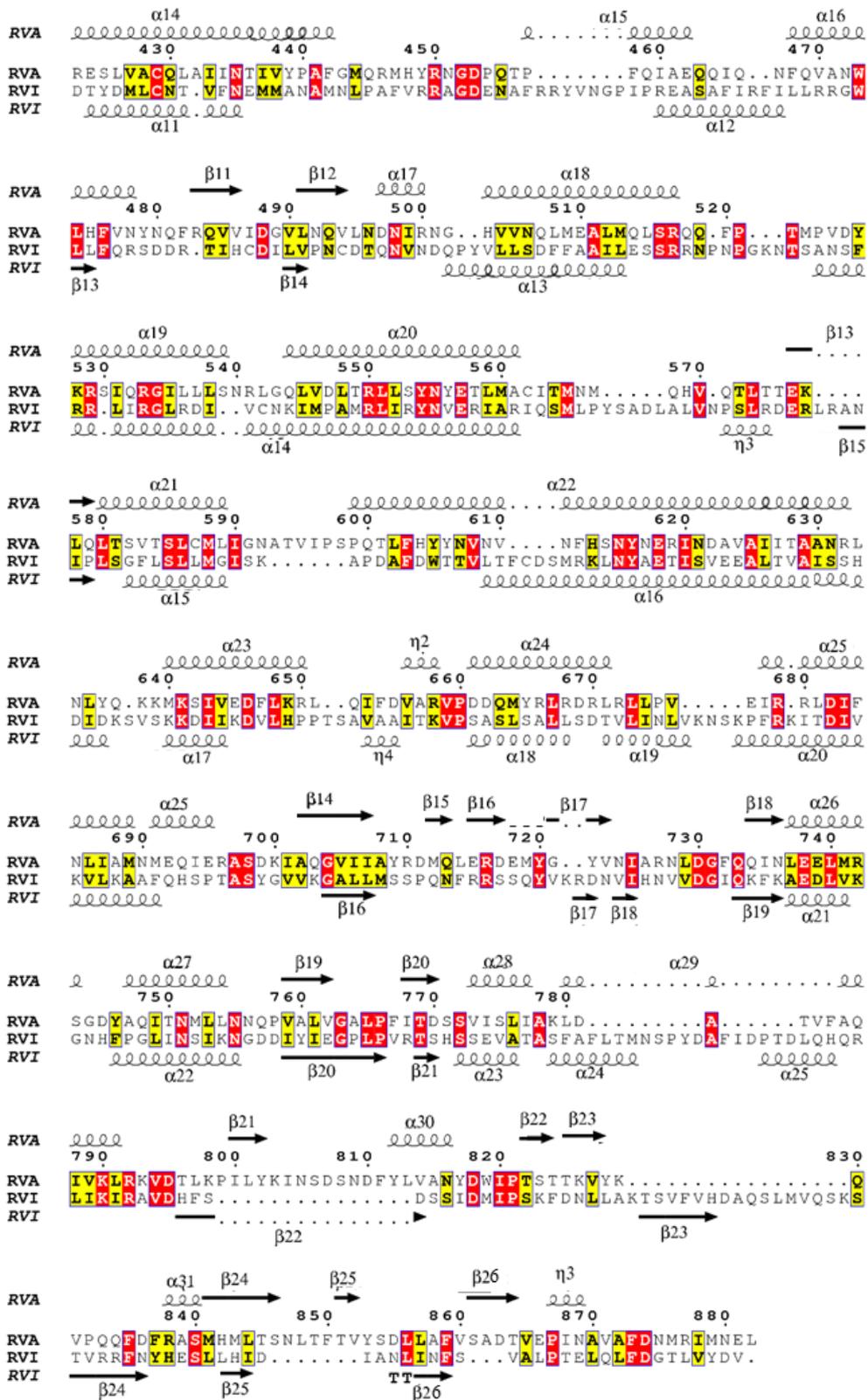
Anexo 9. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2 de la cepa de referencia de RVA y RVD (Continuación)



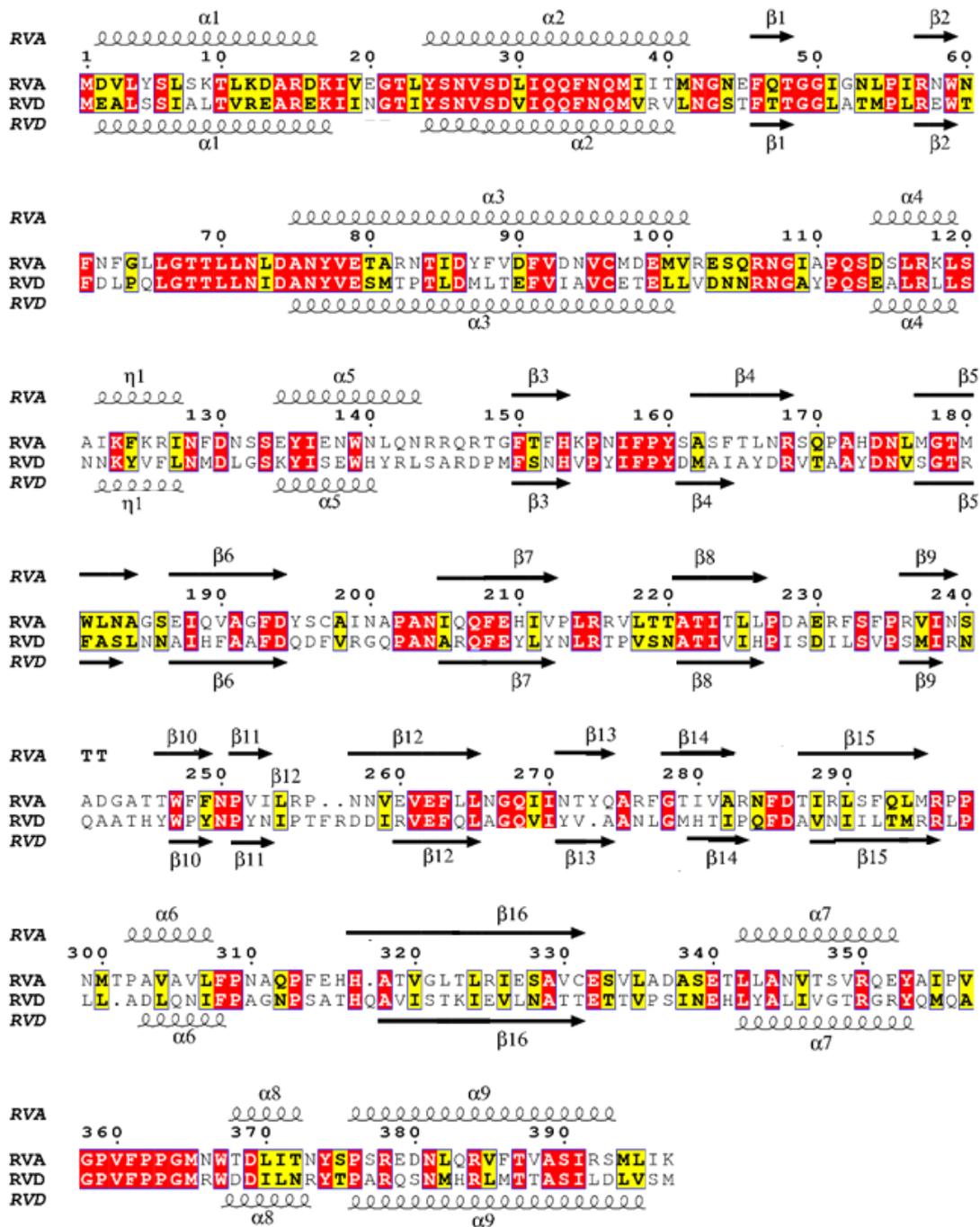
**Anexo 10. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2 de la cepa de referencia de RVA y RVI. Realizados empleando del programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Las ilustraciones han sido generadas empleando el programa EsPrIPT (Robert & Gouet, 2014). Los elementos de estructura secundaria se representan mediante espirales, en el caso de  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ ,  $\eta$ ) y flechas en el caso de láminas- $\beta$ . Los residuos idénticos se indican en fondo rojo y residuos similares se indican en fondo amarillo.**



Anexo 10. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP2 de la cepa de referencia de RVA y RVI. (Continuación)

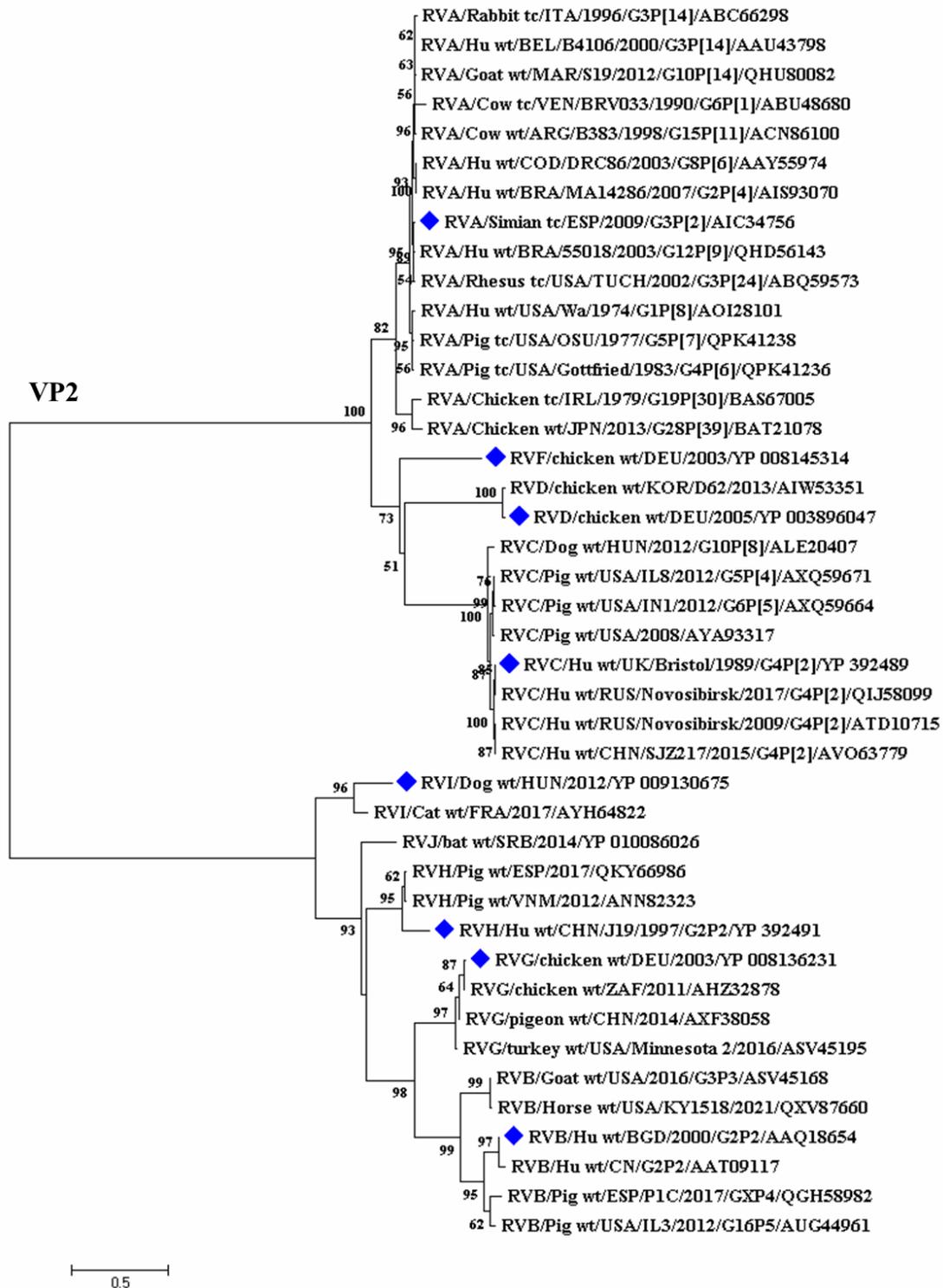


**Anexo 11. Alineamiento estructural de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales VP6 de la cepa de referencia de RVA y RVD. Realizados empleando del programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Las ilustraciones han sido generadas empleando el programa EsPript (Robert & Gouet, 2014). Los elementos de estructura secundaria se representan mediante espirales, en el caso de  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ ,  $\eta$ ) y flechas en el caso de láminas- $\beta$ . Los residuos idénticos se indican en fondo rojo y residuos similares se indican en fondo amarillo.**

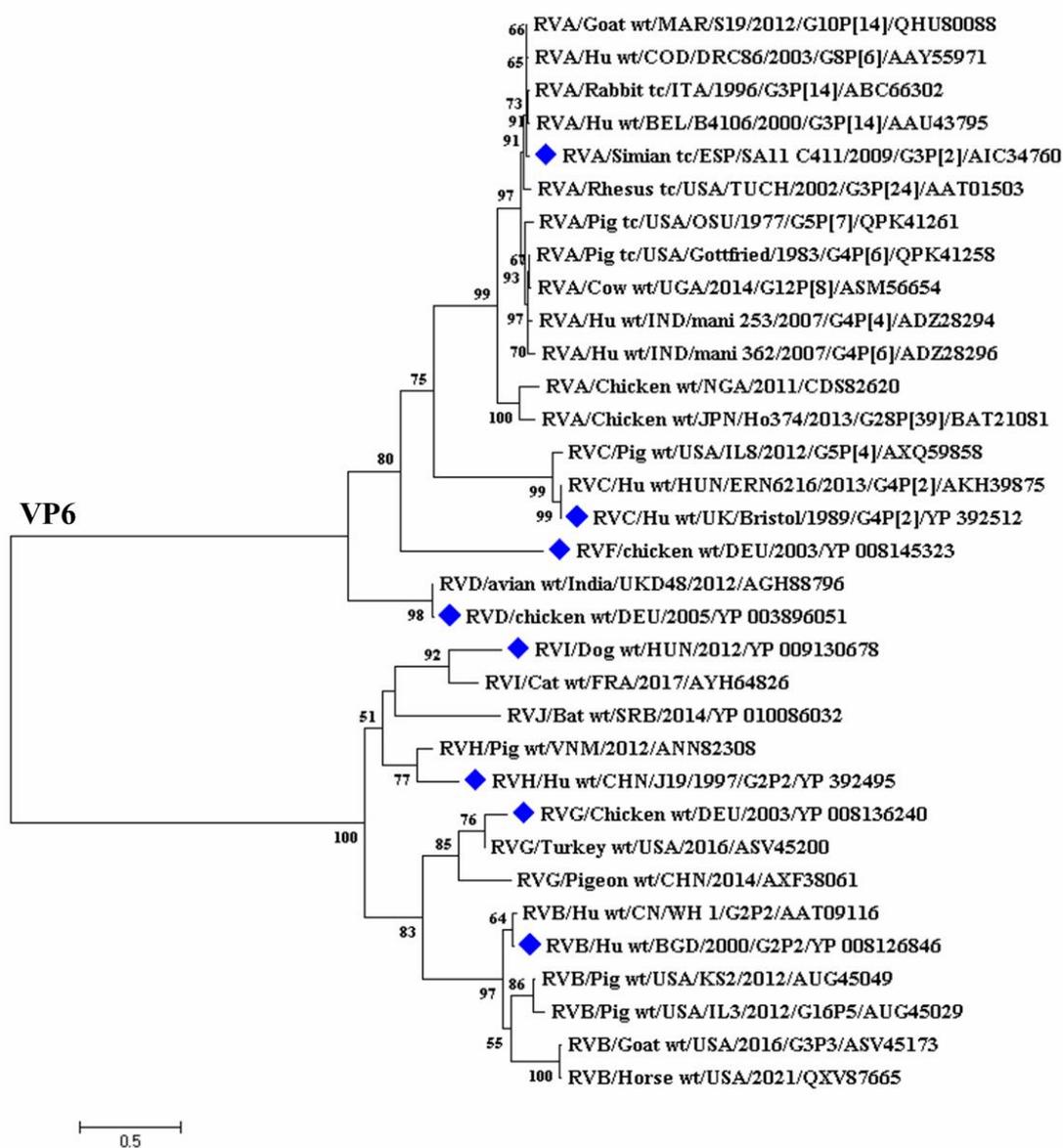




**Anexo 13. Análisis filogenético de la proteína VP2 (1-773 aa) y VP6 (1-378 aa) de todas las especies de rotavirus (RVA-RVJ).** La historia evolutiva fue construida usando el algoritmo *Neighbor-Joining* que utiliza una matriz de distancias por pares estimadas según el modelo de Jones-Thornton-Taylor (Jones et al., 1992; Saitou & Nei, 1987) para secuencias de aminoácidos con un *bootstrap* de 1000 réplicas. Se muestran los valores de *bootstrap* >50%. El árbol está dibujado a escala y la longitud de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 42 secuencias aminoacídicas (8 muestras y 34 referencias) y 33 secuencias aminoacídicas (8 muestras y 25 referencias) para la VP2 y la VP6, respectivamente. Las secuencias utilizadas en este estudio se muestran con un rombo en azul.



Anexo 13. Análisis filogenético de la proteína VP2 (1-773 aa) y VP6 (1-378 aa) de todas las especies de rotavirus (RVA-RVJ) (Continuación)



## *Bibliografía*

---

- Abdelhakim, A. H., Salgado, E. N., Fu, X., Pasham, M., Nicastro, D., Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (2014). Structural Correlates of Rotavirus Cell Entry. *PLoS Pathogens*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004355>
- Agnello, D., Hervé, C. A., Lavaux, A., Darniot, M., Guillon, P., Charpilienne, A., & Pothier, P. (2006). Intrarectal Immunization with Rotavirus 2/6 Virus-Like Particles Induces an Antirovirus Immune Response Localized in the Intestinal Mucosa and Protects against Rotavirus Infection in Mice. *Journal of Virology*, *80*(8), 3823–3832. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.8.3823-3832.2006>
- Aiyegbo, M. S., Sapparapu, G., Spiller, B. W., Eli, I. M., Williams, D. R., Kim, R., Lee, D. E., Liu, T., Li, S., Woods, V. L., Nannemann, D. P., Meiler, J., Stewart, P. L., & Crowe, J. E. (2013). Human Rotavirus VP6-Specific Antibodies Mediate Intracellular Neutralization by Binding to a Quaternary Structure in the Transcriptional Pore. *PLoS ONE*, *8*(5), 12–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061101>
- Anderson, E., & Weber, S. (2004). Rotavirus infection in adults. *The Lancet Infectious Diseases*, *4*(2), 91–99.
- Aoki, S. T., Settembre, E., 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. <https://doi.org/10.1126/science.1170481>
- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V., & López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology*, *70*(9), 5832–5839. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.5832-5839.1996>
- Attoui, H., Mertens, P., Becnel, J., Belaganahalli, S., Bergoin, M., Brussaard, C., & Al, E. (2012). Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: Reoviridae. In A. King, M. Adams, E. Carstens, & E. Lefkowitz (Eds.), *St. Louis*. Amsterdam: Elsevier. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00026-x>
- 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. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1306>
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C. F., & López, S. (2009). Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference. *Journal of Virology*, *83*(17), 8819–8831. <https://doi.org/10.1128/jvi.02308-08>
- Baker, M., & Prasad, B. (2010). Rotavirus Cell Entry. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 343). [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_34](https://doi.org/10.1007/82_2010_34)
- Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K., & Jakab, F. (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution*, *48*(3), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>
- Bass, D. M., Baylor, M. R., Chen, C., Mackow, E. M., Bremont, M., & Greenberg, H. B. (1992). Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *Journal of Clinical Investigation*, *90*(6), 2313–2320. <https://doi.org/10.1172/JCI116119>
- Battles, M. B., & McLellan, J. S. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(4), 233–245. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>
- Bayfield, O. W., Klimuk, E., Winkler, D. C., Hesketh, E. L., Chechik, M., Cheng, N., Dykeman, E. C., Minakhin, L., Ranson, N. A., Severinov, K., Steven, A. C., & Antson, A. A. (2019). Cryo-EM structure and in vitro DNA packaging of a thermophilic virus with supersized T=7 capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(9), 3556–

3561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813204116>
- Beljelarskaya, S. N. (2011). Baculovirus expression systems for production of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Molecular Biology*, 45(1), 123–138. <https://doi.org/10.1134/S002689331101002X>
- Benton, D. J., Gamblin, S. J., Rosenthal, P. B., & Skehel, J. J. (2020). Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH. *Nature*, 583(7814), 150–153. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2333-6>
- Berger, I., Fitzgerald, D. J., & Richmond, T. J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1583–1587. <https://doi.org/10.1038/nbt1036>
- Bergman, H., Henschke, N., Hungerford, D., Pitan, F., Ndwandwe, D., Cunliffe, N., & Soares-Weiser, K. (2021). Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: Vaccines in use. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11:CD00852(Nov 17). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008521.pub6>
- 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(3), 1757–1763. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.1757-1763.2003>
- Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Kühl, A., & Pöhlmann, S. (2010). Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Reviews in Medical Virology*, 20(5), 298–310. <https://doi.org/10.1002/rmv.657>
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. (1973). Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa From Children With Acute Non-Bacterial Gastroenteritis. *The Lancet*, 302(7841), 1281–1283. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- Borodavka, A., Desselberger, U., & Patton, J. T. (2018). Genome packaging in multi-segmented dsRNA viruses: distinct mechanisms with similar outcomes. *Current Opinion in Virology*, 33, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.001>
- Boyle, J. F., & Holmes, K. V. (1986). RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *Journal of Virology*, 58(2), 561–568. <https://doi.org/10.1128/jvi.58.2.561-568.1986>
- Brown, J. C., & Newcomb, W. W. (2011). Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. *Current Opinion in Virology*, 1(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.003>
- Burckhardt, C. J., & Greber, U. F. (2009). Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *PLoS Pathogens*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000621>
- Burke, R. M., Tate, J. E., Kirkwood, C. D., Steele, A. D., & Parashar, U. D. (2019). Current and new rotavirus vaccines. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 32(5), 435–444. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000572>
- Burnett, E., Jonesteller, C. L., Tate, J. E., Yen, C., & Parashar, U. D. (2018). Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions. *Paediatric Drugs*, 20(3), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s40272-018-0283-3>
- Butcher, S. J., Dokland, T., Ojala, P. M., Bamford, D. H., & Fuller, S. D. (1997). Intermediates in the assembly pathway of the double-stranded RNA virus  $\phi 6$ . *EMBO Journal*, 16(14), 4477–4487. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4477>
- Buttafuoco, A., Michaelsen, K., Tobler, K., Ackermann, M., Fraefel, C., & Eichwald, C. (2020). Conserved Rotavirus NSP5 and VP2 Domains Interact and Affect Viroplasm. *Journal of Virology*, 94(7), 1–21. <https://doi.org/10.1128/jvi.01965-19>

- Bwogi, J., Jere, K. C., Karamagi, C., Byarugaba, D. K., Namuwulya, P., Baliraine, F. N., Desselberger, U., & Iturriza-Gomara, M. (2017). Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains. *PLoS ONE*, *12*(6), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178855>
- Caul, E. O., Ashley, C. R., Darville, J. M., & Bridger, J. C. (1990). Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *Journal of Medical Virology*, *30*(3), 201–205. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890300311>
- Changotra, H., & Vij, A. (2017). Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Reviews in Medical Virology*, *27*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
- Charpilienne, A., Nejmeddine, M., Berois, M., Perez, N., Neumann, E., Hewat, E., Trugnan, G., & Cohen, J. (2001). Individual Rotavirus-like Particles Containing 120 Molecules of Fluorescent Protein Are Visible in Living Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(31), 29361–29367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101935200>
- Chen, D. H., Baker, M. L., Hryc, C. F., DiMaio, F., Jakana, J., Wu, W., Dougherty, M., Haase-Pettingell, C., Schmid, M. F., Jiang, W., Baker, D., King, J. A., & Chiu, W. (2011). Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1355–1360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015739108>
- Chen, D., Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M. K., & Ramig, R. F. (1994). Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *Journal of Virology*, *68*(11), 7030–7039. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7030-7039.1994>
- Chen, Dayue, Luongo, C. L., Nibert, M. L., & Patton, J. T. (1999). Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: Evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology*, *265*(1), 120–130. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0029>
- Chen, Dayue, & Ramig, R. F. (1992). Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification. *Virology*, *186*(1), 228–237. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90077-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90077-3)
- Chen, J. Z., Settembre, E. C., Aoki, S. T., Zhang, X., Bellamy, A. R., Dormitzer, P. R., Harrison, S. C., & Grigorieff, N. (2009). Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(26), 10644–10648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904024106>
- Cheng, Y. (2015). Single-particle Cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell*, *161*(3), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.049>
- Chiu, M., Bao, C., & Sadarangani, M. (2019). Dilemmas With Rotavirus Vaccine: The Neonate and Immunocompromised. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *38*(6S Suppl 1), S43–S46. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002322>
- Clark, K. B., Lin, S.-C., Humphrey, C., Foytich, K., Esona, M., Wang, Y., Liu, M., & Jiang, B. (2009). Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. *Virology*, *387*(2), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.023>
- Clark, S. M., Roth, J. R., Clark, M. L., Barnett, B. B., & Spendlove, R. S. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *Journal of Virology*, *39*(3), 816–822. <https://doi.org/10.1128/jvi.39.3.816-822.1981>
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A., & Scherrer, R. (1979). Activation of Rotavirus RNA Polymerase by Calcium Chelation. *Archives of Virology*, *60*, 177–186.
- Crawford, S E, Labbé, M., Cohen, J., Burroughs, M. H., Zhou, Y. J., & Estes, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in

- insect cells. *Journal of Virology*, 68(9), 5945–5952. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5945-5952.1994>
- Crawford, Sue E., Mukherjee, S. K., Estes, M. K., Lawton, J. A., Shaw, A. L., Ramig, R. F., & Prasad, B. V. V. (2001). Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike. *Journal of Virology*, 75(13), 6052–6061. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.13.6052-6061.2001>
- Crawford, Sue 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. *Nature Reviews Disease Primers*, 3:17083(Nov 9), 50–53. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G., & Way, M. (1995). Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, 378(6557), 636–638. <https://doi.org/10.1038/378636a0>
- Davis, T. R., Wickham, T. J., McKenna, K. A., Granados, R. R., Shuler, M. L., & Wood, H. A. (1993). Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 29(5), 388–390. <https://doi.org/10.1007/BF02633986>
- De la Rosa-Trevín, J. M., Otón, J., Marabini, R., Zaldívar, A., Vargas, J., Carazo, J. M., & Sorzano, C. O. S. (2013). Xmipp 3.0: An improved software suite for image processing in electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 184(2), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.09.015>
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Research*, 190, 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Desselberger, U. (2020). What are the limits of the packaging capacity for genomic RNA in the cores of rotaviruses and of other members of the Reoviridae? *Virus Research*, 276(July 2019), 197822. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197822>
- Desselberger, U., Manktelow, E., Li, W., Cheung, W., Iturriza-Gómara, M., & Gray, J. (2009). Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British Medical Bulletin*, 90(1), 37–51. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldp009>
- Desselberger, U., Richards, J., Tchertanov, L., Lepault, J., Lever, A., Burrone, O., & Cohen, J. (2013). Further characterisation of rotavirus cores: ss(+)RNAs can be packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity. *Virus Research*, 178(2), 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.034>
- Diaz-Salinas, M. A., Silva-Ayala, D., Lopez, S., & Arias, C. F. (2014). Rotaviruses Reach Late Endosomes and Require the Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor and the Activity of Cathepsin Proteases To Enter the Cell. *Journal of Virology*, 88(8), 4389–4402. <https://doi.org/10.1128/jvi.03457-13>
- Ding, K., Celma, C. C., Zhang, X., Chang, T., Shen, W., Atanasov, I., Roy, P., & Zhou, Z. H. (2019). In situ structures of rotavirus polymerase in action and mechanism of mRNA transcription and release. *Nature Communications*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10236-7>
- Dormitzer, P., Nason, E., Prasad, B., & Harrison, S. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*, 430(7003)(1), 1053–1058. <https://doi.org/10.1038/nature02836>
- Dormitzer, P. R., Greenberg, H. B., & Harrison, S. C. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology*, 277(2), 420–428. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0625>
- Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y. J., Wagner, G., & Harrison, S. C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO Journal*, 21(5), 885–897. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.885>

- Drugmand, J. C., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, *30*(5), 1140–1157. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.014>
- Eleanor Burnett, Christine L. Jonesteller, Jacqueline E. Tate, Catherine Yen, and U. D. P. (2017). Global Impact of Rotavirus Vaccination on Childhood and Mortality From Diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*, *215*(11): 1, 1666–1672. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix186>
- Eren, E., Zamuda, K., Patton, J. T., & Diseases, I. (2016). Modeling of the rotavirus group C capsid predicts a surface topology distinct from other rotavirus species. *Virology*, *487*(240), 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.017>
- Estes, M. K., & Greenberg, H. B. (2013). Rotaviruses. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6th ed., pp. 1347–1401). Lippincott Philadelphia. Williams & Wilkins.
- Estes, Mary K, Crawford, S. U. E. E., Penaranda, M. E., Petrie, B. L., Burns, J. W., Chan, W., Ericson, B., Smith, G. E., & Summers, M. A. X. D. (1987). Synthesis and Immunogenicity of the Rotavirus Major Capsid Antigen Using a Baculovirus Expression System. *Journal of Virology*, *61*(5), 1488–1494. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.5.1488-1494.1987>
- Estrozi, L. F., & Navaza, J. (2010). Ab initio high-resolution single-particle 3D reconstructions: The symmetry adapted functions way. *Journal of Structural Biology*, *172*(3), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.023>
- Estrozi, L. F., Settembre, E. C., Goret, G., McClain, B., Zhang, X., Chen, J. Z., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. (2013). Location of the dsRNA-Dependent Polymerase, VP1, in Rotavirus Particles. *Journal of Molecular Biology*, *425*(1), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.011>
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., & Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *Journal of General Virology*, *80*(2), 333–339. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-333>
- Fang, Z. Y., Ye, Q., Ho, M. S., Dong, H., Qing, S., Penaranda, M. E., Hung, T., Wen, L., & Glass, R. I. (1989). Investigation of An Outbreak of Adult Diarrhea Rotavirus in China. *Journal of Infectious Diseases*, *160*(6), 948–953. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.6.948>
- Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, *10*(5), 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
- Fernandes, F., Teixeira, A. P., Carinhas, N., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2013). Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert Review of Vaccines*, *12*(2), 225–236. <https://doi.org/10.1586/erv.12.153>
- Fiore, L., Greenberg, H. B., & Mackow, E. R. (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*, *181*(2), 553–563. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90888-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90888-1)
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H., Woode, G. N., Bridger, J. C., & Derrick, J. M. (1974). Relation Between Viruses From Acute Gastroenteritis of Children and Newborn Calves. *The Lancet*, *304*(7872), 61–63. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)91631-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)91631-6)
- Gajardo, R., Vende, P., Poncet, D., & Cohen, J. (1997). Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *Journal of Virology*, *71*(3), 2211–2216. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2211-2216.1997>
- Gallegos, C. O., & Patton, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*, *172*(2), 616–627. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90204-3)

- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., & Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus Spike Protein VP4 Binds to and Remodels Actin Bundles of the Epithelial Brush Border into Actin Bodies. *Journal of Virology*, 80(8), 3947–3956. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.8.3947-3956.2006>
- Gardet, A., Breton, M., Trugnan, G., & Chwetzoff, S. (2007). Role for Actin in the Polarized Release of Rotavirus. *Journal of Virology*, 81(9), 4892–4894. <https://doi.org/10.1128/jvi.02698-06>
- Gilbert, J. M., & Greenberg, H. B. (1998). Cleavage of Rhesus Rotavirus VP4 after Arginine 247 Is Essential for Rotavirus-Like Particle-Induced Fusion from Without. *Journal of Virology*, 72(6), 5323–5327. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.6.5323-5327.1998>
- Glass, R. I., Bresee, J., Jiang, B., Gentsch, J., Ando, T., Fankhauser, R., Noel, J., Parashar, U., Rosen, B., & Monroe, S. S. (2001). Gastroenteritis viruses: An overview. *Novartis Foundation Symposium*, 238, 5–25. <https://doi.org/10.1002/0470846534.ch2>
- 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. *Archives of Virology*, 145(9), 1963–1973. <https://doi.org/10.1007/s007050070069>
- Gotoh, T., Miyazaki, Y., Sato, W., Kikuchi, K. I., & Bentley, W. E. (2001). Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected Sf-9 insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(3), 248–255. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80258-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80258-9)
- Graham, D. Y., & Estes, M. K. (1980). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biologic mechanisms. *Virology*, 101(2), 432–439. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90456-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90456-0)
- Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., Robinson, M. K., & Coulson, B. S. (2003). Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *Journal of Virology*, 77(18), 9969–9978. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9969>
- Greber, U. F. (2002). Signalling in viral entry. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4), 608–626. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8453-3>
- Greig, S. L., Berriman, J. A., O'Brien, J. A., Taylor, J. A., Bellamy, A. R., Yeager, M. J., & Mitra, A. K. (2006). Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 356(1), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.049>
- Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Ziéntras, S., Mertens, P. P. C., Stuart, D., & Stubbs, G. (1999). The atomic structure of bluetongue virus core. *Chemtracts*, 12(13), 907–911.
- Guerrero, C. A., Bouyssouade, D., Zárate, S., Iša, P., López, T., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., López, S., & Arias, C. F. (2002). Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry. *Journal of Virology*, 76(8), 4096–4102. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.4096-4102.2002>
- Guerrero, C. A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S., & Arias, C. F. (2000). Integrin  $\alpha\beta3$  mediates rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14644–14649. <https://doi.org/10.1073/pnas.250299897>
- Harris, R., & Polayes, D. A. (1997). A new baculovirus expression vector for the simultaneous expression of two heterologous proteins in the same insect cell. *Focus*, 19, 10–12.
- Harrison, S. C., & Dormitzer, P. R. (2016). Structure and Function of the Rotavirus Particle. In *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00005-5>

- Harrison, Stephen C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(7), 690–698. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1456>
- Heinimäki, S., Hankaniemi, M. M., Sioofy-Khojine, A. B., Laitinen, O. H., Hyöty, H., Hytönen, V. P., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2019). Combination of three virus-derived nanoparticles as a vaccine against enteric pathogens; enterovirus, norovirus and rotavirus. *Vaccine*, 37(51), 7509–7518. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.072>
- Hendrix, R. W., & Johnson, J. E. (2012). Bacteriophage HK97 capsid assembly and maturation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 726, 351–363. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_15)
- Herrmann, T., Torres, R., Salgado, E. N., Berciu, C., Stoddard, D., Nicastro, D., Jenni, S., & Harrison, S. C. (2021). Functional refolding of the penetration protein on a non-enveloped virus. *Nature*, 590(7847), 666–670. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03124-4>
- Holm, L., Kääriäinen, S., Wilton, C., & Plewczynski, D. (2006). Using Dali for Structural Comparison of Proteins. *Current Protocols in Bioinformatics*, 1–24. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0505s14>
- Holm, L., & Rosenström, P. (2010). Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2), 545–549. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq366>
- Hom, L. G., & Volkman, L. E. (2000). Autographa californica M nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH. *Virology*, 277(1), 178–183. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0586>
- Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-penfield, N. W., Smith, D. F., Pendu, J. Le, Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*, 485(7397), 256–259. <https://doi.org/10.1038/nature10996>
- Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2012). Rotavirus non-structural proteins: Structure and Function. *Current Opinion in Virology*, 2(4), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.06.003>
- Hu, L., Ramani, S., Czako, R., Sankaran, B., Yu, Y., Smith, D. F., Cummings, R. D., Estes, M. K., & Venkataram Prasad, B. V. (2015). Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus. *Nature Communications*, 6(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms9346>
- Hu, Y. C. (2005). Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(4), 405–416. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00078.x>
- Huiskonen, J. T., de Haas, F., Bubeck, D., Bamford, D. H., Fuller, S. D., & Butcher, S. J. (2006). Structure of the Bacteriophage  $\phi$ 6 Nucleocapsid Suggests a Mechanism for Sequential RNA Packaging. *Structure*, 14(6), 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.03.018>
- Hyser, J. M., Collinson-Pautz, M. R., Utama, B., & Estes, M. K. (2010). Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio*, 1(5), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00265-10>
- Ikonomou, L., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1223-9>
- Ilica, S. L., Kotecha, A., Sun, X., Poranen, M. M., Stuart, D. I., & Huiskonen, J. T. (2015). Localized reconstruction of subunits from electron cryomicroscopy images of macromolecular complexes. *Nature Communications*, 6:8843. <https://doi.org/10.1038/ncomms9843>

- Ionel, A., Velázquez-Muriel, J. A., Luque, D., Cuervo, A., Castón, J. R., Valpuesta, J. M., Martín-Benito, J., & Carrascosa, J. L. (2011). Molecular rearrangements involved in the capsid shell maturation of bacteriophage T7. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 234–242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187211>
- Irons, S. L., Chambers, A. C., Lissina, O., King, L. A., & Possee, R. D. (2018). Protein Production using the Baculovirus Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, 91(1), 5.5.1-5.5.22. <https://doi.org/10.1002/cpps.45>
- Ishimwe, E., Hodgson, J. J., Clem, R. J., & Passarelli, A. L. (2015). Reaching the Melting Point: Degradative Enzymes and Protease Inhibitors Involved in Baculovirus Infection and Dissemination. *HHS Public Access*, 479–480(May), 637–649. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.027>
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jarvis, D. L. (2009). Baculovirus-Insect Cell Expression Systems. In *Methods in Enzymology* (pp. 463:191-222). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63014-7)
- Jayaram, H., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research*, 101(1), 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.007>
- Jenni, S., Salgado, E. N., Herrmann, T., Li, Z., Grant, T., Grigorieff, N., Trapani, S., Estrozi, L. F., & Harrison, S. C. (2019). In situ Structure of Rotavirus VP1 RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 431(17), 3124–3138. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.016>
- Jiménez-Zaragoza, M., Yubero, M. P. L., Martín-Forero, E., Castón, J. R., Reguera, D., Luque, D., de Pablo, P. J., & Rodríguez, J. M. (2018). Biophysical properties of single rotavirus particles account for the functions of protein shells in a multilayered virus. *ELife*, 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.37295>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Jonesteller, C. L., Burnett, E., Yen, C., Tate, J. E., & Parashar, U. D. (2017). Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016. *Clinical Infectious Diseases*, 65(5), 840–850. <https://doi.org/10.1093/cid/cix369>
- Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A. M., Servin, A. L., & Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *Journal of Virology*, 71(11), 8268–8278.
- Kainov, D. E., Pirttimaa, M., Tuma, R., Butcher, S. J., Thomas, G. J., Bamford, D. H., & Makeyev, E. V. (2003). RNA Packaging Device of Double-stranded RNA Bacteriophages, Possibly as Simple as Hexamer of P4 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48084–48091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306928200>
- Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H., & Greenberg, H. B. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *Journal of Virology*, 62(4), 1136–1144. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.4.1136-1144.1988>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 114(9), 2343–2348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618424114>
- Kaur, S., Gomez-blanco, J., Khalifa, A. A. Z., Adinarayanan, S., Sanchez-garcia, R., Wrapp, D., McLellan, J. S., Bui, K. H., & Vargas, J. (2021). Local computational methods to improve the interpretability and analysis of cryo-EM maps. *Nature Communications*, *12*(1):1240(Feb 23). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21509-5>
- Kazemi, M., Sorzano, C., Carazo, J., Georges, A., Abrishami, V., & Vargas, J. (2021). ENRICH: a fast method to improve the quality of flexible macromolecular reconstructions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *164*(Sep), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.01.001>
- Kielian, M., & Rey, F. A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: More than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(1), 67–76. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1326>
- Kim, I. S., Trask, S. D., Babyonyshev, M., Dormitzer, P. R., & Harrison, S. C. (2010). Effect of Mutations in VP5\* Hydrophobic Loops on Rotavirus Cell Entry. *Journal of Virology*, *84*(12), 6200–6207. <https://doi.org/10.1128/jvi.02461-09>
- 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. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1610>
- Kimura, Y., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata, S., Chiba, S., & Kimura, Y. (1989). An Outbreak Of Gastroenteritis Associated With Acute Rotaviral Infection In Schoolchildren. *Journal of Infectious Diseases*, *160*(4), 611–615. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.4.611>
- Kirkwood, C. D. (2010). Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: Potential impact on vaccination programs. *Journal of Infectious Diseases*, *202*, 43–48. <https://doi.org/10.1086/653548>
- Komoto, S., Fukuda, S., Ide, T., Ito, N., Sugiyama, M., Yoshikawa, T., Murata, T., & Taniguchi, K. (2018). Generation of Recombinant Rotaviruses Expressing Fluorescent Proteins by Using an Optimized Reverse Genetics System. *Journal of Virology*, *92*(13), 1–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.00588-18>
- Komoto, S., Fukuda, S., Murata, T., & Taniguchi, K. (2020). Reverse genetics system for human rotaviruses. *Microbiology and Immunology*, *64*(6), 401–406. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12795>
- Komoto, S., Wakuda, M., Ide, T., Niimi, G., Maeno, Y., Higo-Moriguchi, K., & Taniguchi, K. (2011). Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *Journal of General Virology*, *92*(12), 2914–2921. <https://doi.org/10.1099/vir.0.033886-0>
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, *23*(5), 567–575. <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Kumar, D., Yu, X., Crawford, S. E., Moreno, R., Jakana, J., Sankaran, B., Anish, R., Kaundal, S., Hu, L., Estes, M. K., Wang, Z., & Prasad, B. V. V. (2020). 2.7 Å cryo-EM structure of rotavirus core protein VP3, a unique capping machine with a helicase activity. *Science Advances*, *6*(16), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6410>
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, *31*(1), 58–83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
- Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D., & Cohen, J. (1994). Identification of the

- nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *Journal of General Virology*, 75(12), 3423–3430. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3423>
- Labbé, M., Charpilienne, A., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Cohen, J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*, 65(6), 2946–2952. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.2946-2952.1991>
- Laimbacher, A. S., Esteban, L. E., Castello, A. A., Abdusetir Cerfoglio, J. C., Argüelles, M. H., Glikmann, G., D'Antuono, A., Mattion, N., Berois, M., Arbiza, J., Hilbe, M., Schraner, E. M., Seyffert, M., Dresch, C., Epstein, A. L., Ackermann, M., & Fraefel, C. (2012). HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. *Molecular Therapy*, 20(9), 1810–1820. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.108>
- Lawton, J. A., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology*, 4(2), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nsb0297-118>
- Lawton, J., Estes, M., & Prasad, B. V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. In *Advances in virus research* (Issue 55, pp. 185–229). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(00\)55004-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(00)55004-0)
- Lee, J. M., Chung, H. Y., Kim, K. Il, Yoo, K. H., Hwang-Bo, J., Chung, I. S., & Park, J. H. (2011). Synthesis of double-layered rotavirus-like particles using internal ribosome entry site vector system in stably-transformed *Drosophila melanogaster*. *Biotechnology Letters*, 33(1), 41–46. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0390-x>
- Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Cohen, J., & Rey, F. A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO Journal*, 20(7), 1498–1507. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1498>
- Li, T., Lin, H., Zhang, Y., Li, M., Wang, D., Che, Y., Zhu, Y., Li, S., Zhang, J., Ge, S., Zhao, Q., & Xia, N. (2014). Improved characteristics and protective efficacy in an animal model of E. coli-derived recombinant double-layered rotavirus virus-like particles. *Vaccine*, 32(17), 1921–1931. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.093>
- Li, Z., Baker, M. L., Jiang, W., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2009). Rotavirus Architecture at Subnanometer Resolution. *Journal of Virology*, 83(4), 1754–1766. <https://doi.org/10.1128/jvi.01855-08>
- Lipfert, J., Skinnera, G. M., Keegstra, J. M., Hensgens, T., Jagera, T., Dulina, D., Köber, M., Yu, Z., Donkers, S. P., Chou, F. C., Das, R., & Dekker, N. H. (2014). Double-stranded RNA under force and torque: Similarities to and striking differences from double-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), 15408–15413. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407197111>
- Liu, M., Mattion, N. M., & Estes, M. K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*, 188(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90736-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90736-9)
- Liu, Y., Xu, S., Woodruff, A. L., Xia, M., Tan, M., Kennedy, M. A., & Jiang, X. (2017). Structural basis of glycan specificity of P[19] VP8\*: Implications for rotavirus zoonosis and evolution. *PLoS Pathogens*, 13(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006707>
- Lopez, S., & Arias, C. F. (2006). Early steps in rotavirus cell entry. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 309, 39–66. [https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7_2)
- López, S., & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: A Versaillesque dance. *Trends in Microbiology*, 12(6), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.003>

- López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C. F., & López, S. (2005). Silencing the Morphogenesis of Rotavirus. *Journal of Virology*, 79(1), 184–192. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.1.184-192.2005>
- Lozach, P. Y., Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Late-penetrating viruses. *Current Opinion in Virology*, 1(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.004>
- Lu, X., McDonald, S. ., Tortorici, M. A., Tao, Y. J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M. L., Patton, J. T., & Harrison, S. C. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure*, 16(11), 1678–1688. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.09.006>
- Ludert, J. E., Krishnaney, A. A., Burns, J. W., Vo, P. T., & Greenberg, H. B. (1996). Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *Journal of General Virology*, 77(3), 391–395. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-3-391>
- Luisoni, S., Suomalainen, M., Boucke, K., Tanner, L. B., Wenk, M. R., Guan, X. L., Grzybek, M., Coskun, U., & Greber, U. F. (2015). Co-option of membrane wounding enables virus penetration into cells. *Cell Host and Microbe*, 18(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.06.006>
- Maass, D. R., & Atkinson, P. H. (1990). Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *Journal of Virology*, 64(6), 2632–2641. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.6.2632-2641.1990>
- Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. . (Eds.). (2011). *Fenner's Veterinary Virology. Chapter 15 - Reoviridae* (4th Ed). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.00015-8>
- Marsh, M., & Helenius, A. (2006). Virus entry: Open sesame. *Cell*, 124(4), 729–740. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., & Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.028>
- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Collins, J., Goyal, S., Ciarlet, M., & Matthijnssens, J. (2013). Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology*, 446(1–2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.001>
- Más, V., & Melero, J. (2013). Entry of enveloped viruses into host cells: membrane fusion. *Subcellular Biochemistry*, 68, 467–487. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_16)
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V. V., Cohen, J., & Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*, 20(7), 1485–1497. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1485>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J. T., Rahman, M., & Van Ranst, M. (2008). Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, 82(7), 3204–3219. <https://doi.org/10.1128/jvi.02257-07>
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M., & Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*, 157(6), 1177–1182. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B., Bellamy, A., & Harrison, S. (2010). X-ray crystal structure of

- the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 397(2), 587–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.055>
- Mena, J. A., Ramirez, O. T., & Palomares, L. A. (2006). Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*, 122(4), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.005>
- Mena, J. A., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2007). Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles. *BMC Biotechnology*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-39>
- Mertens, P. (2004). The dsRNA viruses. *Virus Research*, 101(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.002>
- Mukherjee, A., Ghosh, S., Bagchi, P., Dutta, D., Chattopadhyay, S., Kobayashi, N., & Chawla-Sarkar, M. (2011). Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from north-eastern India: Evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1343–1346. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03383.x>
- Musalem, C., & Espejo, R. T. (1985). Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *Journal of General Virology*, 66(12), 2715–2724. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-12-2715>
- Naggie, S., & Bentley, W. E. (1998). Appearance of protease activities coincides with p10 and polyhedrin-driven protein production in the baculovirus expression system: Effects on yield. *Biotechnology Progress*, 14(2), 227–232. <https://doi.org/10.1021/bp980002b>
- Ng, T. F. F., Mesquita, J. R., Nascimento, M. S. J., Kondov, N. O., Wong, W., Reuter, G., Knowles, N. J., Vega, E., Esona, M. D., Deng, X., Vinjé, J., & Delwart, E. (2014). Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Veterinary Microbiology*, 171(1–2), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.005>
- Noad, R., & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438–444. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7)
- O'Brien, J. A., Taylor, J. A., & Bellamy, A. R. (2000). Probing the Structure of Rotavirus NSP4: a Short Sequence at the Extreme C Terminus Mediates Binding to the Inner Capsid Particle. *Journal of Virology*, 74(11), 5388–5394. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.11.5388-5394.2000>
- O'Neal, C. M., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Conner, M. E. (1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *Journal of Virology*, 71(11), 8707–8717. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8707-8717.1997>
- Palomares, L. A., Mena, J. A., & Ramírez, O. T. (2012). Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles. *Methods*, 56(3), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.004>
- Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2009). Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.02.006>
- Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Martella, V., & Bányai, K. (2013). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary Microbiology*, 165(3–4), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.020>
- Parez, N., Fourgeux, C., Mohamed, A., Dubuquoy, C., Pillot, M., Dehee, A., Charpilienne, A., Poncet, D., Schwartz-Cornil, I., & Garbarg-Chenon, A. (2006). Rectal Immunization with Rotavirus Virus-Like Particles Induces Systemic and Mucosal Humoral Immune Responses and Protects Mice against Rotavirus Infection. *Journal of Virology*, 80(4), 1752–1761.

- <https://doi.org/10.1128/jvi.80.4.1752-1761.2006>
- Patton, J. T., & Gallegos, C. O. (1990). Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *Journal of General Virology*, *71*(5), 1087–1094. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1087>
- Patton, J T, Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y. W., & Xiaobo, J. (1997). Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *Journal of Virology*, *71*(12), 9618–9626. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9618-9626.1997>
- Patton, John T., Vasquez-Del Carpio, R., Tortorici, M. A., & Taraporewala, Z. F. (2006). Coupling of Rotavirus Genome Replication and Capsid Assembly. *Advances in Virus Research*, *69*(06), 167–201. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69004-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69004-0)
- Patton, John T. (2012). Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery Medicine*, *13*(68), 85–97.
- Pedley, S., Bridger, J. C., Chasey, D., & McCrae, M. A. (1986). Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *Journal of General Virology*, *67*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-1-131>
- Peixoto, C., Sousa, M. F. Q., Silva, A. C., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2007). Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. *Journal of Biotechnology*, *127*(3), 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.08.002>
- Pêra, F. F., Mutepfa, D. L. R., Khan, A. M., Els, J. H., Mbewana, S., Van Dijk, A. A. A., Rybicki, E. P., & Hitzeroth, I. I. (2015). Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal*, *12*:205(Dec 2). <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0436-8>
- Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2001). The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(4), 1381–1386. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1381>
- Philip, A. A., & Patton, J. T. (2021). Rotavirus as an Expression Platform of Domains of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Vaccines (Basel)*, *May 03*, 9(5). <https://doi.org/10.1101/2021.02.18.431835>
- Prasad, B. V.V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q. Y., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., & Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, *382*(6590), 471–474. <https://doi.org/10.1038/382471a0>
- Prasad, B. V.Venkataram, Wang, G. J., Clerx, J. P. M., & Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *Journal of Molecular Biology*, *199*(2), 269–275. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90313-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90313-0)
- Ramani S, Sankaran P, Arumugam R, Sarkar R, Banerjee I, Mohanty I, Jana AK, Kuruvilla KA, K. G. (2010). Comparison of viral load and duration of virus shedding in symptomatic and asymptomatic neonatal rotavirus infections. *Journal of Medical Virology*, *82*(10)(Oct), 1803–1807. <https://doi.org/10.1002/jmv.21872>
- Ready, K. F. M., & Sabara, M. (1987). In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology*, *157*(1), 189–198. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90328-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90328-x)
- Reddy, D. A., Bergmann, C. C., Meyer, J. C., Berriman, J., Both, G. W., Colipar, B. E. H., Boyle, D. B., Andrew, M. E., & Bellamy, A. R. (1992). Rotavirus VP6 modified for expression on the plasma membrane forms arrays and exhibits enhanced immunogenicity. *Virology*, *189*(2), 423–434. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90566-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90566-8)
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C. M., & Murhammer, D. W. (1997). Comparison of *Trichoplusia ni*

- BTI-Tn-5b1-4 (high five and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(6), 909–920. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970920\)55:6<909::AID-BIT8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970920)55:6<909::AID-BIT8>3.0.CO;2-K)
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42 (Web Se(Jul)). <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rodríguez-Limas, W. A., Tyo, K. E. J., Nielsen, J., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-33>
- Rodríguez, J. M., Chichón, F. J., Martín-Forero, E., González-Camacho, F., Carrascosa, J. L., Castón, J. R., & Luque, D. (2014). New Insights into Rotavirus Entry Machinery: Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. *PLoS Pathogens*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004157>
- Rodríguez, J. M., & Luque, D. (2019). Structural Insights into Rotavirus Entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1140, 45–68. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14741-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14741-9_3)
- Ruiz, M C, Charpilienne, A., Liprandi, F., Gajardo, R., Michelangeli, F., & Cohen, J. (1996). The concentration of Ca<sup>2+</sup> that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *Journal of Virology*, 70(8), 4877–4883. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.4877-4883.1996>
- Ruiz, Marie Christine, Abad, M. J., Charpilienne, A., Cohen, J., & Michelangeli, F. (1997). Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *Journal of General Virology*, 78(11), 2883–2893. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-11-2883>
- Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K. C., Naseem, S., & Sattar, S. (2018). Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in Medical Virology*, 28(6), 1–13. <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Saldaña, S., Esquivel Guadarrama, F., Olivera Flores, T. J., Arias, N., Lópe, S., Arias, C., Ruiz-Medrano, R., Mason, H., Mor, T., Richter, L., Arntzen, C., & Gómez, L. (2006). Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunology*, 19(1), 42–53. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.42>
- Salgado, E. N., Upadhyayula, S., & Harrison, S. C. (2017). Single-Particle Detection of Transcription following Rotavirus Entry. *Journal of Virology*, 91(18), 1–18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00651-17>
- Santos, N., & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15(1), 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
- Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L., & Castón, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: An amphipathic  $\alpha$  helix as a molecular switch. *Structure*, 13(7), 1007–1017. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.04.012>
- Scheres, S. H. W. (2012). RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology*, 180(3), 519–530. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006>

- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO Journal*, *30*(2), 408–416. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.322>
- Sieczkarski, S. B., & Whittaker, G. R. (2004). Viral entry. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *285*, 1–23. [https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6_1)
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S., Arias, C. F., & Estes, M. K. (2013). Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(25), 10270–10275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304932110>
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2004). Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasms. *Journal of Virology*, *78*(14), 7763–7774. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7763-7774.2004>
- Slack, J. M., Kuzio, J., & Faulkner, P. (1995). Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology*, *76*(5), 1091–1098. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-5-1091>
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, *3*(12), 2156–2165. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.12.2156-2165.1983>
- Sorzano, C. O., de la Rosa Trevín, J. M., Otón, J., Vega, J. J., Cuenca, J., Zaldívar-Peraza, A., Gómez-Blanco, J., Vargas, J., Quintana, A., Marabini, R., & Carazo, J. M. (2013). Semiautomatic, High-Throughput, High-Resolution Protocol for Three-Dimensional Reconstruction of Single Particles in Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology*, *950*, 171–193. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-137-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-137-0_11)
- Summers, M. D. (2006). Milestones Leading to the Genetic Engineering of Baculoviruses as Expression Vector Systems and Viral Pesticides. *Advances in Virus Research*, *68*(06), 3–73. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68001-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68001-9)
- Suomalainen, M., & Greber, U. F. (2013). Uncoating of non-enveloped viruses. *Current Opinion in Virology*, *3*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.12.004>
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Konno, T., Sato, T., & Ishida, N. (1985). Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Archives of Virology*, *85*(1–2), 25–34. <https://doi.org/10.1007/BF01317003>
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Sato, T., Konno, T., Iwasaki, Y., Numazaki, Y., & Ishida, N. (1986). Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Archives of Virology*, *91*(1–2), 135–144. <https://doi.org/10.1007/BF01316734>
- Suzuki, H., Konno, T., Kitaoka, S., Sato, T., Ebina, T., & Ishida, N. (1984). Further observations on the morphogenesis of human rotavirus in MA 104 cells. *Arch Virol.*, *79*(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1007/BF01310808>
- Suzuki, Hiroshi. (2019). Rotavirus replication: Gaps of knowledge on virus entry and morphogenesis. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, *248*(4), 285–296. <https://doi.org/10.1620/tjem.248.285>
- Tao, Y., Farsetta, D. L., Nibert, M. L., & Harrison, S. C. (2002). RNA synthesis in a cage - Structural

- studies of reovirus polymerase  $\lambda 3$ . *Cell*, 111(5), 733–745. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01110-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01110-8)
- 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 Journal*, 15(17), 4469–4476. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00824.x>
- Taylor, J., O'Brien, J., Lord, V., Meyer, J., & Bellamy, A. (1993). The RER-localized rotavirus intracellular receptor a truncated purified soluble form is multivalent and binds virus particles. *Virology*, 194(2), 807–814. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1322>
- Te Velthuis, A. J. W. (2014). Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(22), 4403–4420. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1695-z>
- Tihova, M., Dryden, K. A., Bellamy, A. R., Greenberg, H. B., & Yeager, M. (2001). Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: Implications for cell entry. *Journal of Molecular Biology*, 314(5), 985–992. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.5238>
- Trask, S. D., & Dormitzer, P. R. (2006). Assembly of Highly Infectious Rotavirus Particles Recoated with Recombinant Outer Capsid Proteins. *Journal of Virology*, 80(22), 11293–11304. <https://doi.org/10.1128/jvi.01346-06>
- Trask, S. D., Kim, I. S., Harrison, S. C., & Dormitzer, P. R. (2010). A Rotavirus Spike Protein Conformational Intermediate Binds Lipid Bilayers. *Journal of Virology*, 84(4), 1764–1770. <https://doi.org/10.1128/jvi.01682-09>
- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 165–177. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- 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., ... 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. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(9), 909–948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)
- Troeger, C., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Blacker, B. F., Ahmed, T., Armah, G., Bines, J. E., Brewer, T. G., Colombara, D. V., Kang, G., Kirkpatrick, B. D., Kirkwood, C. D., Mwenda, J. M., Parashar, U. D., Petri, W. A., Riddle, M. S., Steele, A. D., Thompson, R. L., ... Reiner, R. C. (2018). Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatrics*, 172(10), 958–965. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
- Trugnan, G., Cortes-Perez, N. G., Sapin, C., Jaffrelo, L., Daou, S., Grill, J. P., Langella, P., Seksik, P., Beaugerie, L., & Chwetzoff, S. (2010). Rotavirus-like particles: A novel nanocarrier for the gut. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/317545>
- Urasawa, T., Urasawa, S., & Taniguchi, K. (1981). Sequential Passages of Human Rotavirus in MA-104 Cells. *Microbiology and Immunology*, 25(10), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1981.tb00109.x>
- Vende, P., Tortorici, M. A., Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2003). Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis. *Virology*, 313(1), 261–273. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00302-7](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00302-7)

- Vieira, H. L. A., Estêvão, C., Roldão, A., Peixoto, C. C., Sousa, M. F. Q., Cruz, P. E., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2005). Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *Journal of Biotechnology*, *120*(1), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.026>
- Vlasova, A. N., Amimo, J. O., & Saif, L. J. (2017). Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses*, *9*(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/v9030048>
- Ward, R. L., Knowlton, D. R., & Pierce, M. J. (1984). Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, *19*(6), 748–753. <https://doi.org/10.1128/jcm.19.6.748-753.1984>
- Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L., & Wood, H. A. (1992). Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System. *Biotechnology Progress*, *8*(5), 391–396. <https://doi.org/10.1021/bp00017a003>
- Wolf, M., Deal, E. M., & Greenberg, H. B. (2012). Rhesus Rotavirus Trafficking during Entry into MA104 Cells Is Restricted to the Early Endosome Compartment. *Journal of Virology*, *86*(7), 4009–4013. <https://doi.org/10.1128/jvi.06667-11>
- Yamauchi, Y., & Greber, U. F. (2016). Principles of Virus Uncoating: Cues and the Snooker Ball. *Traffic*, *17*(6), 569–592. <https://doi.org/10.1111/tra.12387>
- Yang, Y., Li, X., Yang, H., Qian, Y., Zhang, Y., Fang, R., & Chen, X. (2011). Immunogenicity and virus-like particle formation of rotavirus capsid proteins produced in transgenic plants. *Science China Life Sciences*, *54*(1), 82–89. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-4104-3>
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C. A., Arias, C. F., & López, S. (2000). Integrin  $\alpha 2\beta 1$  mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology*, *278*(1), 50–54. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0660>
- Zárate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C. F., & López, S. (2004). VP7 Mediates the Interaction of Rotaviruses with Integrin  $\alpha v\beta 3$  through a Novel Integrin-Binding Site. *Journal of Virology*, *78*(20), 10839–10847. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.20.10839-10847.2004>
- Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Cohen, J., Estes, M. K., & Ramig, R. F. (1996a). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *Journal of Virology*, *70*(5), 2736–2742. <https://doi.org/10.1007/BF01311081>
- Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Cohen, J., Estes, M. K., & Ramig, R. F. (1996b). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *Journal of Virology*, *70*(5), 2736–2742. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.5.2736-2742.1996>
- Zhang, X., Walker, S. B., Chipman, P. R., Nibert, M. L., & Baker, T. S. (2003). Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å. *Nature Structural & Molecular Biology*, *10*(12), 1011–1018. <https://doi.org/10.1038/nsb1009>
- Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., & Zhang, Z. (2011). Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. *Bioconjugate Chemistry*, *22*(3), 346–352. <https://doi.org/10.1021/bc1002532>
- Zhou, H., Guo, L., Wang, M., Qu, J., Zhao, Z., Wang, J., & Hung, T. (2011). Prime immunization with rotavirus VLP 2/6 followed by boosting with an adenovirus expressing VP6 induces protective immunization against rotavirus in mice. *Virology Journal*, *8*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-3>