



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE ENTRADA
DE LOS ROTAVIRUS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

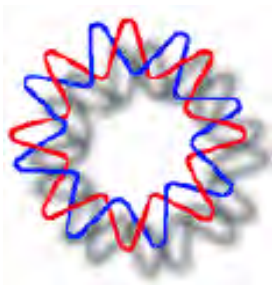
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MICHELLE GUTIÉRREZ MAYRET

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN



CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el laboratorio de la Dra. Susana López y del Dr. Carlos Arias, del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Susana López Charretón.

Comité tutorial:

Dr. Gustavo Pedraza Alva

Dr. Ramón González García Conde

Dra. Susana López Charretón

Jurado de examen:

Dra. Susana López Charretón

Dra. Rosa María del Angel

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Dr. Luis Cárdenas Torres

Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su apoyo y cariño incondicional

A toda mi familia, en especial a mis queridas y ocurrentes sobrinas, a mi suegra por ser tan comprensiva y brindarnos tanto cariño y apoyo

A Juan por todo su amor, apoyo, compañerismo y por darme el mejor regalo: nuestro bebé =)

A Susana por todo lo que me ha enseñado

A Carlos por sus críticas y consejos que enriquecieron este trabajo

A todos los miembros del laboratorio Arias-López por hacer agradable cada día. En especial a Don Pedrito y a Pavel que tanto me apoyaron en este camino.

A mis amigos del lunch y las comidas: Rafa, Vic y Marco Antonio. Gracias por las buenas charlas y por estar ahí cuando los he necesitado.

A mi comité tutorial, Dr. Ramón González y al Dr. Gustavo Pedraza, por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus comentarios y críticas al trabajo

A los encargados de docencia, Gloria y Toño por toda su ayuda prestada durante mi estancia en el Instituto

Gracias a todos

Tabla de contenido

I.	Resumen	6
II.	Abstract	7
III.	Introducción	8
	Tipos de endocitosis	9
	Endocitosis mediada por clatrina	12
	Endocitosis mediada por caveolas	13
	Macropinocitosis	14
	Endocitosis independiente de clatrina y de caveolina	15
	Tráfico intracelular	17
	Endocitosis como vía de entrada de virus	22
	Los virus pueden entrar a la célula utilizando diferentes rutas	27
	Entrada de rotavirus a la célula	28
IV.	Objetivo general	36
V.	Objetivos particulares.....	36
VI.	Materiales y métodos.....	37
VII.	Resultados	48
	A. Comparación de la vía de entrada de varias cepas	48
	La infectividad de las cuatro cepas depende de la presencia de colesterol	49
	Las cuatro cepas de rotavirus analizadas interactúan con hsc70.....	51
	La acidificación de los endosomas es necesaria para la infectividad de algunas cepas de rotavirus	52
	La inhibición de la macropinocitosis o de la endocitosis mediada por caveolas no disminuyen la infectividad de rotavirus.....	54
	Tratamientos que alteran la endocitosis mediada por clatrina afectan la infectividad de algunas cepas de rotavirus.....	57

Papel de dinamina en la entrada de rotavirus	60
Dinamina y clatrina son importantes durante la entrada de rotavirus.....	61
El papel del colesterol, pH y la endocitosis mediada por clatrina es en la entrada de rotavirus.....	63
B. Papel del citoesqueleto en la entrada de rotavirus	65
C. Caracterización del tráfico intracelular de las cepas de rotavirus.....	67
D. Las proteínas que participan en tráfico intravesicular, evaluadas en este trabajo, afectan la entrada de rotavirus y no un evento posterior.....	74
VIII. Discusión.....	77
IX. Conclusiones.....	83
X. Perspectivas.....	84
XI. Referencias	85
XII. Anexos	95
Anexo 1. Artículo: Revisión de endocitosis como entrada de virus	95
Anexo 2. Artículo: Revisión de entrada de rotavirus.....	95
Anexo 3. Artículo: Caracterización de la entrada de las cuatro cepas	95

I. Resumen

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y virus. Existen varios mecanismos de endocitosis y en este trabajo exploramos el papel de las vías más conocidas en la entrada de rotavirus. A través de utilizar drogas, evaluar el fenotipo de mutantes dominantes negativas y el silenciamiento de proteínas mediante RNA de interferencia, encontramos que la entrada de algunas cepas de rotavirus está mediada por clatrina y requiere del pH ácido de la vía endosomal. En el caso de la cepa de simio RRV su entrada parece ser independiente de clatrina y del pH ácido. Explorando el tráfico intracelular de las distintas cepas, mostramos que a pesar de que usan diferentes rutas para entrar, las cepas comparten varias proteínas durante el tráfico intracelular, lo que sugiere que convergen en algún compartimento celular. Nuestros resultados indican que las cepas transitan por la vía endosomal, llegando a los endosomas tempranos y pasando hasta los endosomas tardíos (y quizás los lisosomas). Además, mostramos que la entrada de todas las cepas utilizadas en este trabajo depende del colesterol y requiere de la interacción con la proteína de choque térmico hsc70, uno de los receptores caracterizados para rotavirus.

II. Abstract

Endocytosis is the process by which solutes, molecules, and viruses enter the cell. There are several mechanisms of endocytosis and in this work we evaluate the role of the most characterized pathways for rotavirus cell entry. By using different strategies such as drugs, dominant negative mutants and protein silencing by RNA interference, we showed that the entry of some rotavirus strains is mediated by clathrin and requires the acidification of the endosomal pathway. In the case of the simian strain RRV, its entry appears to be clathrin and pH independent. When exploring the intracellular trafficking of different rotavirus strains, we found that despite using different routes of entry, distinct rotavirus strains share several cellular proteins that participate in the intracellular traffic suggesting that they might finally converge in the same cellular compartment. Our results indicate that rotavirus particles transit through the endosomal pathway, moving from early endosomes to late endosomes and perhaps also into lysosomes. Furthermore, we showed that the entry of all strains used in this work depend on cholesterol and require the interaction with heat shock protein Hsc70, a known receptor for rotavirus.

III. Introducción

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos, a las que generalmente se les denomina cargo. Este proceso celular consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares como son la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis, tanto celular como del organismo completo [1].

Este proceso celular está constituido por una red de varios organelos los cuales difieren en su composición proteica y propiedades bioquímicas (Figura 1). Existen diferentes rutas de endocitosis que son usadas por la célula para llevar a cabo distintas funciones (Figura 1) [2, 3]. Sin embargo, dados los avances metodológicos recientes, así como la complejidad de este proceso, se siguen encontrando nuevas rutas cuya caracterización es aún incompleta. Actualmente, hay varios criterios para clasificar los diferentes tipos de endocitosis, estos son: el tipo de molécula que se internaliza (toxina, virus, receptor), el componente que cubre la vesícula (clatrina, caveolina, flotilina, etc.), la participación de GTPasas en el proceso, el mecanismo de escisión de la vesícula de la membrana y la participación del citoesqueleto de actina, entre otros [2].

La endocitosis comienza con la formación de vesículas endocíticas las cuales se liberan de la membrana plasmática. Este proceso involucra varias etapas; la captura del cargo, la inducción de la curvatura de membrana, la dilatación de la curvatura y finalmente, la liberación de la vesícula la cual es dirigida a los organelos endosomales. De ahí, el cargo puede ser distribuido a otros organelos. Las

vesículas endocíticas son dirigidas a los endosomas que son responsables de la distribución, reciclaje, degradación o almacenamiento del cargo. Los organelos endosomales son los endosomas tempranos, los endosomas tardíos, los lisosomas y los endosomas de reciclaje [4].

Los endosomas tempranos se encuentran distribuidos en el citosol, mientras que los endosomas tardíos, los lisosomas y los endosomas de reciclaje se localizan principalmente alrededor del núcleo. Así que el cargo internalizado puede llegar a diferentes lugares en la célula. La presencia de las GTPasas de la familia Rab contribuye a la diferenciación entre los distintos tipos de endosomas (ver más adelante). Estas GTPasas son importantes en la regulación del tráfico intracelular porque median la fusión entre las vesículas y los endosomas y/o a otros organelos [5].

Tipos de endocitosis

La endocitosis puede ser clasificada en fagocitosis o pinocitosis de acuerdo al tamaño del cargo que es internalizado (Figura 1). El mecanismo de fagocitosis está restringido a células especializadas como son los macrófagos y las amibas. Esta vía es empleada principalmente para internalizar partículas grandes como bacterias o desechos celulares [6]. Sin embargo, partículas pequeñas como los virus también pueden hacer uso de esta vía para ingresar a la célula (ver más adelante). En la fagocitosis, los rearrreglos en el citoesqueleto de actina son inducidos para proyectar una extensión grande de membrana plasmática que rodea la partícula a ser internalizada para finalmente, a través de la acción de dinamina (una GTPasa que se describirá posteriormente), generar un organelo de varias micras de diámetro llamado fagosoma [7]. Existen varias proteínas involucradas en este proceso como son las GTPasas que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina (RhoA, Cdc42 y

Rac1), así como las proteínas activadoras del complejo Arp2/3, encargado de promover la nucleación y el ensamble de filamentos de actina [8], como WASP y WAVE [6].

En la pinocitosis hay ingestión de soluto y agua y también este proceso es responsable de la entrada de macromoléculas y patógenos a la célula. La pinocitosis puede ocurrir por varios mecanismos (Figura 1) [2, 9]. Algunos de estos procesos, al igual que en la fagocitosis, dependen de la acción de dinamina para escindir la vesícula endocítica de la membrana plasmática [10-13] (Figura 1).

Dinamina es una proteína multifuncional que tiene varios dominios además del de GTPasa [10]. Esta enzima presenta un dominio de unión a fosfoinosítidos (con el cual se recluta a la membrana), un dominio efector de la GTPasa, y un dominio PRD con el que interactúa con proteínas que poseen el dominio SH3 [14]. Entre las características de dinamina está su capacidad de autoensamblarse tanto *in vitro* como *in vivo* formando estructuras tipo collar de perlas que se acumulan en los cuellos de las vesículas recién generadas [15]. Se ha propuesto que dinamina actúa como una mecano-enzima que mediante la hidrólisis de GTP, genera la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas endocíticas de la membrana [16].

A continuación se da una breve descripción de las rutas endocíticas más conocidas hasta el momento y que han sido clasificadas de acuerdo a las proteínas que recubren a las vesículas endocíticas.

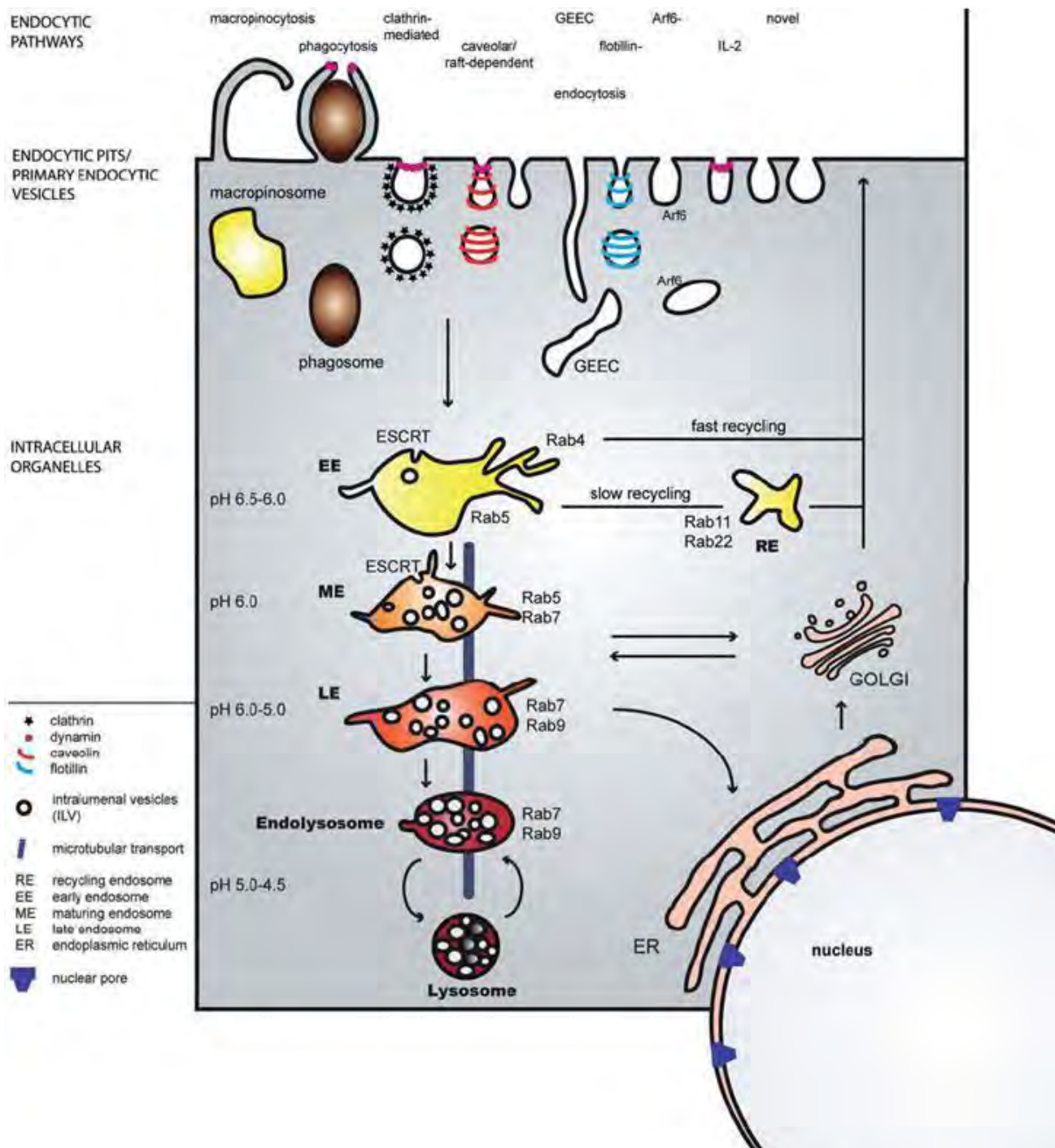


Figura 1. Esquema general de las diferentes rutas de endocitosis. Se muestran las distintas vías de endocitosis y la maquinaria molecular asociada a cada ruta. Tomada de Schelhaas M [17].

Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de moléculas a la célula. Este tipo de endocitosis requiere una serie de componentes estructurales para poder formar la vesícula de manera que pueda ser internalizada. Uno de estos componentes y por el cual esta vía recibe su nombre, es la clatrina. La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada “el triesqueleto” (triskelion) de clatrina [18]. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β_2 , μ_2 y σ_2). El complejo AP-2 interactúa con clatrina, a través de la subunidad β_2 , y estimula su polimerización generando una malla de clatrina que cubre la vesícula (Figura 2). Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta que se forma la vesícula endocítica. La fisión de la vesícula cubierta con clatrina es controlada por la GTPasa dinamina (Figura 2). En general, las moléculas -incluidos los virus- que entran a la célula por endocitosis mediada por clatrina son expuestas al ambiente ácido de los endosomas.

Es interesante mencionar que hay evidencia que sugiere la existencia de diferentes poblaciones de vesículas cubiertas con clatrina [19, 20]. La formación de vesículas de clatrina aún en ausencia de la subunidad μ_2 del complejo AP-2 indica que hay otras proteínas adaptadoras encargadas de reclutar clatrina a la membrana celular [19]. En particular, ya se ha demostrado que la internalización de marcadores de la endocitosis mediada por clatrina, como son el factor de crecimiento epidérmico y el receptor de la lipoproteína de baja densidad, no se afectan cuando se inhibe la expresión de la subunidad μ_2 del complejo AP-2 mientras que sí se afecta cuando se inhibe

la expresión de clatrina [19]. En contraste, la endocitosis de transferrina, otro marcador de esta vía, fue muy afectada cuando se inhibió la expresión de ambas proteínas [19]. Estos resultados sugieren que existen adaptadores alternativos y que el complejo AP-2 no es esencial para el reclutamiento de clatrina a la membrana. Existen diferentes maneras de inhibir esta vía de endocitosis. Desde tratamientos como choque hipertónico con sacarosa o el uso de clorpromazina, hasta siRNAs o mutantes dominantes negativos que afectan la funcionalidad de los componentes estructurales de la vía (Tabla 1).

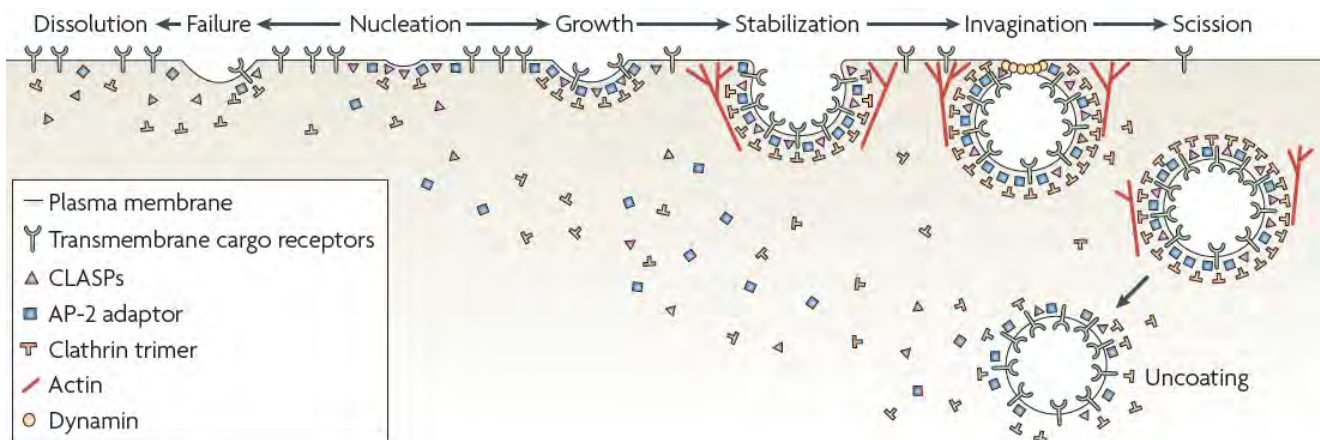


Figura 2. Pasos involucrados en el ensamblaje de la cubierta con clatrina. Se muestran los pasos secuenciales involucrados en la formación de las vesículas cubiertas con clatrina y algunos de los componentes clave que participan en cada etapa. Tomada de Traub LM [21].

Endocitosis mediada por caveolas

La segunda vía mejor caracterizada es la mediada por las caveolas (Figura 1). En esta ruta, las caveolinas son el principal componente estructural de las vesículas. A diferencia de clatrina que requiere proteínas accesorias para ser reclutada a la membrana, las caveolinas son proteínas

integrales de membrana que están asociadas a microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos, también llamados balsas lipídicas [22]. La formación de la caveola depende de la expresión de caveolina-1, en células no musculares y de caveolina-3, en células de músculo [22]. Estas proteínas forman oligómeros que recubren a las vesículas las cuales son liberadas de la membrana plasmática, a través de la acción de dinamina y son transportadas a estructuras llamadas caveosomas los cuales están presentes en el interior de la célula [23]. La ausencia de marcadores para endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje, indica que los caveosomas representan un nuevo tipo de organelos. A diferencia de los endosomas, el lumen de estos organelos tiene pH neutro. El tratamiento de las células con genisteína, un inhibidor de cinasas de tirosina extraído de la soya, bloquea la invaginación de las caveolas [24]. Se sabe que la cinasa Src fosforila a la caveolina-1 en la tirosina 14 y esto incrementa la dinámica de las caveolas. En la Tabla 1 se muestran otras maneras que se han utilizado para inhibir esta vía.

Macropinocitosis

A diferencia de las otras vías de endocitosis, la macropinocitosis involucra la remodelación de grandes extensiones de la membrana plasmática a través de cambios en el citoesqueleto de actina lo que culmina con la internalización de fluido en grandes vacuolas llamadas macropinosomas (Figura 1) [25, 26]. Este es un proceso transitorio, comúnmente inducido por factores de crecimiento que activan receptores de tirosin-cinasas, promoviendo cascadas de señalización que inducen cambios en el citoesqueleto de actina y en la membrana plasmática. Esta vía comparte varias características con la fagocitosis, ambas rutas requieren de la remodelación del citoesqueleto de actina para proyectar

grandes extensiones de membrana y además, ambos procesos culminan con la formación de grandes vacuolas u organelos [25]. Sin embargo, la macropinocitosis la puede llevar a cabo cualquier tipo celular y el volumen de fluido que se internaliza es mayor que en la fagocitosis. Algunos de los tratamientos que han sido empleados para bloquear esta vía se indican en la Tabla 1.

Entre las proteínas involucradas en el proceso de regulación de la macropinocitosis se encuentran las GTPasas Rac y Cdc42 las cuales activan a la cinasa PAK1 encargada de regular la dinámica del citoesqueleto de actina [27]. Además, PAK1, una cinasa que fosforila serinas y treoninas, activa a la proteína CtBP1 que es necesaria para que se cierre el macropinosoma [28]. La inhibición de los intercambiadores Na^+/H^+ por amilorida o derivados de ésta, bloquean esta vía [29]. Además, los agentes que alteran la polimerización del citoesqueleto de actina y mutantes dominantes negativos de Rac, Cdc42 o PAK1, también afectan este mecanismo de endocitosis [29, 30].

Es importante mencionar que estas proteínas tienen otras funciones en la célula y es necesario combinar estrategias experimentales para asegurar que el cargo en particular que se está estudiando utiliza esta vía de entrada (Tabla 1).

Endocitosis independiente de clatrina y de caveolina

Algunas vías de endocitosis que han sido parcialmente caracterizadas recientemente son independientes tanto de clatrina, como de caveolina y sin embargo, pueden o no depender de dinamina [2]. Por ejemplo, la internalización del receptor de la interleucina 2 (IL-2) se caracteriza por su independencia a clatrina y caveolina, su dependencia a dinamina y a colesterol (Figura 1). Además, el uso de mutantes dominantes negativos de la GTPasa RhoA, encargada de la remodelación del

citoesqueleto de actina, demostró que esta vía está regulada por esta enzima [31]. La endocitosis del receptor de citocinas γ_c , que requiere de la polimerización de actina, también se lleva a cabo por esta vía [32].

Dentro de los cargos que entran por una vía independiente tanto de clatrina como de caveolina y dinamina, se encuentran las proteínas ancladas a glicosil-inositol-fosfato (GPI). En general, las proteínas ancladas a GPI entran a la célula por esta vía y son dirigidas a compartimentos endosomales tempranos enriquecidos en proteínas ancladas a GPI, GEECs (por sus siglas en inglés de GPI-AP enriched early endosomal compartments) [33]. Los GEECs son compartimentos endosomales distintos, que no colocalizan con caveolina (Figura 1). La inhibición de la endocitosis mediada por clatrina y el uso de mutantes de dinamina, no inhiben la internalización de estas proteínas. La expresión de una dominante negativa de la GTPasa Cdc42 sí inhibe esta vía [33].

Por otro lado, otra GTPasa, Arf6 (Figura 1), ha sido implicada en la regulación de la internalización de diversas moléculas celulares como son el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) clase I, la integrina $\beta 1$ y la proteína prion [34-36]. Además de esta GTPasa, otros componentes como son las balsas lipídicas y dinamina también han sido involucrados en el ingreso de estas moléculas a la célula [35].

Recientemente, Glebov *et al*, encontraron que flotilina-1, una proteína marcadora de balsas lipídicas, participa en una nueva vía de endocitosis (Figura 1) [37]. Esta novedosa ruta fue descrita al caracterizar la internalización de proteínas asociadas a glicosilfosfatidilinositol (específicamente, CD59-GPI). Estos investigadores encontraron que estas proteínas entran a la célula a través de una vía que es dependiente de flotilina pero independiente de clatrina, caveolina y dinamina [37]. Por otro

lado, Payne *et al*, mediante el uso de drogas, RNAi y la expresión transitoria de proteínas encontraron que la entrada de los proteoglicanos es independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina. Además, estos autores encontraron que estas moléculas y sus ligandos entran directamente a los endosomas tardíos dado que estos complejos (proteoglicanos y sus ligandos catiónicos) co-localizan con Rab9 pero no con Rab5 [38]. Esta vía de endocitosis ilustra el hecho de que dependiendo del cargo, los componentes celulares requeridos en su internalización cambian. También existe evidencia de que un mismo cargo que es internalizado en diferentes contextos celulares, puede utilizar distintos componentes endocíticos [24, 39].

Tráfico intracelular

A pesar de que un cargo utilice diferentes mecanismos para entrar, la mayoría si no es que todas las vesículas endocíticas, son dirigidas a los endosomas tempranos, la primera estación en el tráfico intracelular [9] (Figura 1). Estudios usando fluoróforos sensibles a pH y mediciones de intensidad de fluorescencia han mostrado que los endosomas tempranos son medianamente ácidos, con un pH alrededor de 6. Este pH ácido es generado por la ATPasa vacuolar [40]. En los endosomas tempranos, las moléculas internalizadas que son recicladas a la membrana celular, como el receptor de transferrina, son dirigidos a los dominios tubulares de estos organelos los cuales eventualmente se liberan y forman endosomas de reciclaje. En contraste, las proteínas que son transportadas a los endosomas tardíos y lisosomas son dirigidos a las regiones vesiculares de los endosomas tempranos (Figura 1). De manera general, la internalización de un cargo ocurre de la siguiente manera: la unión del ligando al receptor favorece la formación de la vesícula endocítica. Esta vesícula entrega su cargo

a los endosomas tempranos (o endosomas de distribución), organelos con un pH ácido donde se localizan las Rab GTPasas 4 y 5. El pH ácido de estos compartimentos puede promover la disociación del ligando de su receptor. Usualmente, el ligando permanece en la vía endosomal mientras que el receptor es reciclado a la membrana celular, vía los endosomas de reciclamiento (donde está localizada Rab11), o a través de Rab4 [41, 42]. Las moléculas que son destinadas a degradación o que requieren llegar al interior celular, cerca del núcleo, entran a los endosomas tardíos (también conocidos como cuerpos multivesiculares -MVBs-) [43]. En estos organelos, con un pH menor que los endosomas tempranos, se localizan las GTPasas Rab7 y Rab9. Finalmente, la molécula endocitada llega a los lisosomas donde puede ser degradada por enzimas que están activas en un ambiente ácido [44]. En el transcurso de toda esta ruta endocítica, existen posibles vías de escape que evitan llegar a la degradación en los lisosomas (Figura 1).

Como se mencionó previamente, las Rab GTPasas contribuyen a la identidad de los endosomas y además, regulan la fusión de la vesícula endocítica a diferentes organelos [5, 45]. Las Rab GTPasas (y en general todas las GTPasas) son proteínas que sufren modificaciones post-traduccionales (usualmente prenilaciones o geranilaciones) para ser ancladas a la membrana y poder activarse mediante la acción de una proteína intercambiadora de nucleótido de guanina o GEF por sus siglas en inglés (Figura 3). Es en la forma activa (Rab-GTP) que las GTPasas pueden interactuar con otras proteínas, llamadas efectoras y llevar a cabo su función. Rab5 es una proteína importante en la regulación y coordinación de la fusión de las vesículas endocíticas a los endosomas tempranos, mientras que Rab7 es importante para la fusión de la vesícula a los endosomas tardíos y, además es clave para la biogénesis de los lisosomas [46]. En el caso de Rab9, se ha reportado que esta enzima,

presente en los endosomas tardíos, participa en el tráfico de enzimas del Golgi a la vía endosomal [47] (Figura 1).

Tabla 1. Estrategias usadas para el estudio de las distintas vías de endocitosis

Vía	Inhibidor	Efecto	Observaciones
Dependiente de Clatrina	Clorpromazina	Inhibe el ensamble de la malla de clatrina [48]	Puede afectar la fluidez y permeabilidad de la membrana [49]
	Medio sin potasio/con sacarosa	Polimerización anormal de clatrina. Remueve las vesículas cubiertas de la membrana [50, 51]	La disminución de potasio en el medio puede tener otros efectos como la inhibición del transporte de proteínas secretoras [52]
	Mutantes dominantes negativas de eps15	Evita el reclutamiento de AP-2 a la membrana celular, inhibiendo la formación de la malla de clatrina[53]	No inhibe aquellas vesículas con cubierta de clatrina que no dependen del complejo AP-2 [19]
	siRNAs cadena pesada de clatrina	Inhiben específicamente la expresión de clatrina [48]	
Dependiente de Caveola	Ciclodextrina	Secuestra el colesterol de la membrana [54]	Puede provocar efectos no específicos [55].
	Dominante negativa de caveolina	Inhibe la asociación de la caveolina a las balsas lipídicas [56]	
	siRNAs caveolina	Inhiben específicamente la expresión de caveolina [54]	
Macropinocitosis	Citocalasina D	Previene la polimerización de actina [57, 58]	Puede inhibir la entrada de moléculas que entran por otras rutas de endocitosis [59]
	Amilorida	Inhibe intercambiadores Na^+/H^+ [29]	Inespecífico [60]
	Toxina B de <i>C. difficile</i>	Inhibe a las GTPasas Rac, Cdc42 y Rho [61]	Las Rho GTPasas pueden participar en otras vías [31, 33]
Flotilina	siRNAs flotilina	Inhiben específicamente la expresión de flotilina [37]	

Se conocen varias de las proteínas efectoras de las Rab GTPasas. Una de ellas es el antígeno de los endosomas tempranos 1 o EEA1 por sus siglas en inglés. Esta proteína es considerada un marcador de endosomas tempranos ya que es reclutada a éstos endosomas a través de su dominio FYVE que une fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P), lípido enriquecido en estos organelos [62]. EEA1 es uno de los efectores de Rab5, que forma parte del complejo de fusión de la vesícula a los endosomas [63-65]. Es EEA1 la que interactúa directamente con las proteínas SNARE, encargadas de llevar a cabo la fusión de las dos membranas (la vesícula endocítica y el endosoma temprano) [63, 66].

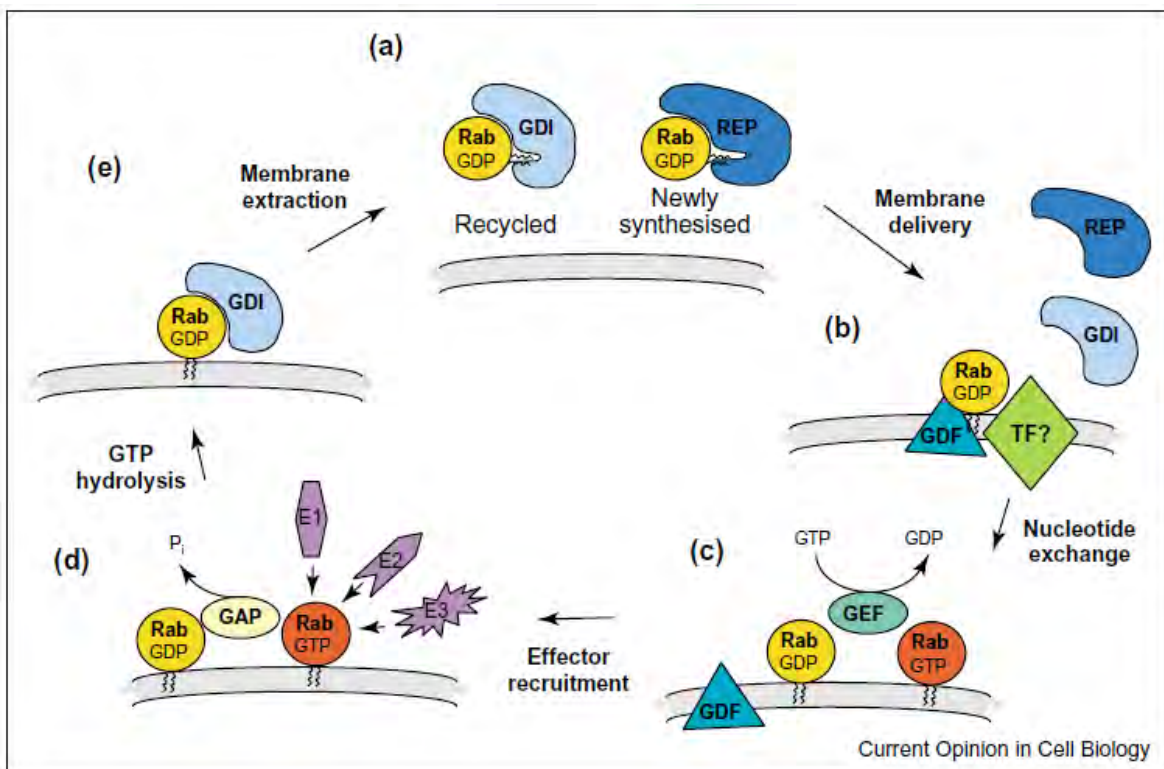


Figura 3. Ciclo de reclutamiento y activación de las Rab GTPasas. (A) Las proteínas Rab unidas a GDP (Rab-GDP) forman un complejo citosólico con RabGDI, inhibidor de la disociación de GDP. (B) La entrega a la membrana y el desplazamiento de RabGDI está mediada por GDF o factor de desplazamiento de GDI. (C) El desplazamiento de RabGDI expone la modificación post-traduccional y la Rab-GDP es anclada a la membrana donde es activada por un factor intercambiador de nucleótido o GEF. (D) La Rab-GTP recluta proteínas efectoras a la membrana. (E) La hidrólisis de GTP es estimulada por una proteína activadora de la GTPasa o GAP lo que regresa a la Rab a su estado inactivo y su consecuente, extracción de la membrana plasmática por GDI. Tomada de Seabra MC & Wasmeier C [67].

Existen distintos motivos consenso, presentes en diferentes moléculas, que promueven su internalización. Los más conocidos son los que favorecen el ingreso por la endocitosis mediada por clatrina [21]. Sin embargo, se ha encontrado que ubiquitina, una proteína de bajo peso molecular que se añade a las lisinas de las proteínas blanco a través de varias reacciones enzimáticas [68], es otra señal de distribución a la vía endosomal [68-70]. Recientemente, se encontró que la ubiquitina es reconocida por varias proteínas que son miembros de los complejos ESCRT (por sus siglas en inglés, Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Estos complejos son importantes tanto para la distribución del cargo (principalmente ubiquitinado), como para la formación de los cuerpos multivesiculares (Figura 1) [71, 72]. Existen cuatro complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III [73]. Básicamente las funciones de cada complejo son las siguientes: el complejo ESCRT-0 reconoce y agrupa el cargo a distribuir, ESCRT-I genera la curvatura de membrana junto con el complejo de ESCRT-II y finalmente, el complejo ESCRT-III escinde la vesícula intraluminal (ILV por sus siglas en inglés) de la membrana hacia el lumen del endosoma tardío, comenzando así la formación de los MVBs (Figura 4) [73]. Es importante mencionar que la localización del cargo en estos MVBs es compleja ya que puede estar asociado a la membrana del organelo, al lumen de los endosomas tardíos o bien dentro o en la membrana de estas vesículas intraluminales [43].

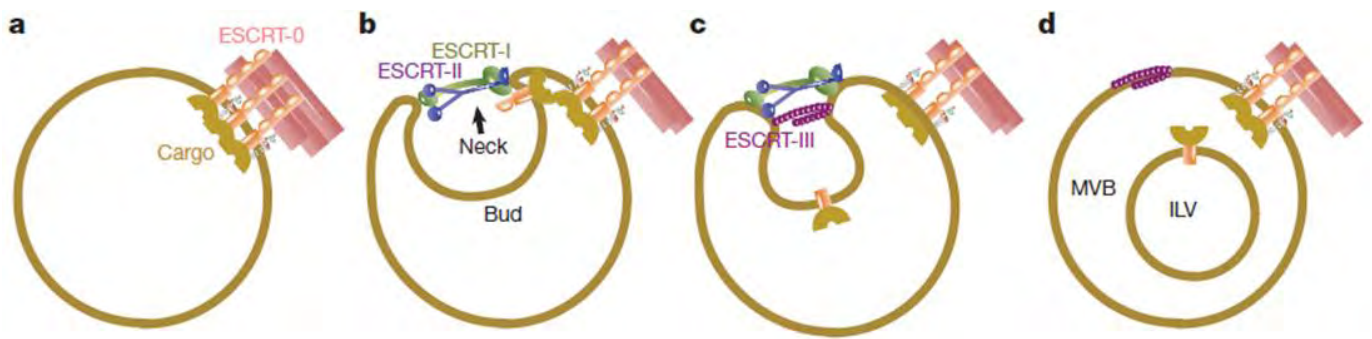


Figura 4. Participación del complejo ESCRT en la formación de los MVBs. (A) El complejo ESCRT-0 se auto-ensambla y promueve el agrupamiento del cargo. (B) Los complejos ESCRT-I y -II tienen varios sitios de unión a membrana que promueven la generación de la invaginación de la membrana. (C) El complejo ESCRT-III recluta proteínas al cuello de la vesícula que promueven su liberación hacia el interior del endosoma tardío. (D) El cargo es internalizado en la vesícula intraluminal (ILV) mientras que la ATPasa Vps4 disocia el complejo ESCRT de la membrana. Tomada de Wollert T & Hurley JH [74].

Endocitosis como vía de entrada de virus

Los virus son parásitos intracelulares obligados, formados por una cubierta proteica (cápside) que rodea el material genético. Algunos virus tienen además, una envoltura lipídica (proveniente de la célula que infectó previamente) rodeando la cápside. El ciclo replicativo de cualquier virus comienza con la unión de éste a sus receptores (entre ellos integrinas, gangliósidos, glicoproteínas, etc.) lo cual provoca cambios en la partícula viral que favorecen las siguientes etapas. Una vez que el virus ha reconocido a sus receptores, el siguiente paso es la penetración de la membrana celular. Este paso puede darse a nivel de la membrana plasmática o en membranas intracelulares de diferentes organelos dependiendo de los requerimientos de cada virus [75]. Muchos virus utilizan las vías de endocitosis para entrar a la célula (Anexo 1), mientras que pocos atraviesan directamente la membrana celular por un mecanismo llamado penetración directa. Cabe señalar que la jornada de un virus no termina cuando llega al interior de la célula, a partir de ese momento, la partícula viral

requiere desnudarse, es decir, liberar el genoma viral para que pueda ser replicado y traducido. Finalmente, las proteínas virales se ensamblan para generar nuevas partículas virales que salen de la célula y son capaces de infectar a otras células (Figura 7).

La entrada de un virus por endocitosis le da varias ventajas. Primero, las partículas virales son internalizadas sólo en aquellas células que realizan un transporte membranar activo. Segundo, evitan la barrera del citoesqueleto de actina cortical la cual se encuentra por debajo de la membrana plasmática. Y por último, los organelos endocíticos proveen de ambientes que facilitan la penetración viral. Las proteasas endosomales o el bajo pH de estos organelos, son algunos de los recursos más usados por los virus para facilitar procesos tales como el desnudamiento de la partícula.

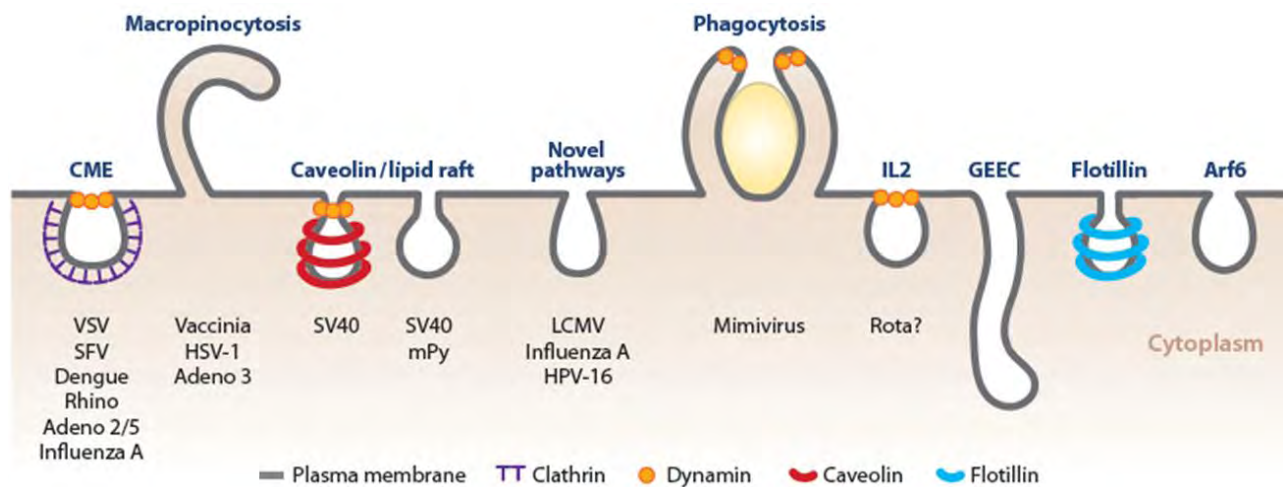


Figura 5. Ejemplos de virus que utilizan las distintas rutas de endocitosis para ingresar a la célula. Se muestran las distintas vías de endocitosis y la maquinaria molecular asociada a cada ruta. Tomada de Mercer J *et al* [9].

Existen varios ejemplos de virus que utilizan las diferentes rutas de endocitosis para ingresar a la célula (Figura 5) [3, 9]. En el caso de la fagocitosis, los mimivirus, un virus envuelto que infecta

amibas, entra por esta vía [76]. La entrada de este virus fue explorada mediante el uso de virus y proteínas celulares etiquetados con fluoróforos, mutantes dominantes negativos y drogas. Los autores encontraron que el ingreso de mimivirus a la célula, depende de actina y dinamina mientras que la macropinocitosis fue descartada porque inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ no le afectan [76].

La endocitosis mediada por clatrina es uno de los mecanismos más utilizados entre los virus (Figura 5). Esta vía la utilizan virus como papilomavirus, el virus del Nilo, el virus de la estomatitis vesicular, influenza, reovirus y dengue, entre otros [77-82].

En general, las moléculas -incluidos los virus- que entran a la célula están expuestas al ambiente ácido de los endosomas y pueden responder al bajo pH sufriendo cambios conformacionales. En el caso de los virus, estos cambios conformacionales permiten la exposición de péptidos de fusión los cuales a su vez interactúan con la membrana del endosoma facilitando su liberación al citosol. Dependiendo del pH que se requiera para provocar el cambio conformacional, el sitio de penetración de los virus puede ser desde los endosomas tempranos (que tienen un pH 6.5 a 6.0), tardíos (pH 6.0 a 5.5) hasta los lisosomas (pH 5.5 a 4). Un ejemplo de un virus que sufre una fusión que es catalizada por un ambiente ácido, es el virus de Influenza. En la superficie celular, el virus se une a receptores que tienen ácido siálico a través de las cabezas globulares de la glicoproteína viral hemaglutinina (HA). El virus es entonces internalizado vía la endocitosis mediada por clatrina y el bajo pH de los endosomas tardíos provoca cambios conformacionales en las cabezas globulares de la proteína HA. Esto expone el péptido de fusión, el cual es una región altamente hidrofóbica de la proteína. Además, estos cambios lo acercan a la membrana del endosoma con lo cual la fusión de la

membrana viral con la endosomal se puede llevar a cabo y el genoma viral es liberado al citoplasma. Si estos cambios conformacionales se inducen antes de que el virus sea internalizado, mediante un tratamiento de las partículas virales con pH ácido, por ejemplo, el virus se inactiva y pierde su infectividad [83].

Por otro lado, en algunos casos se ha visto que el pH ácido no es suficiente para inducir algún cambio conformacional, necesario para facilitar la fusión de la partícula viral con el endosoma. Se ha reportado que algunos virus son activados a través de cortes proteolíticos que son llevados a cabo por proteasas endosomales, como las catepsinas (que son proteasas cuya actividad depende de pH). En este caso el pH endosomal es necesario para activar a la proteasa, que al cortar alguna proteína viral, promueve el cambio conformacional de la partícula viral lo que favorece a su vez la penetración al citoplasma celular [84, 85].

SV40, el virus de la leucemia murina y los ecovirus son representantes de virus que entran a su célula huésped a través de la vía de las caveolas (Figura 5) [86-88]. En el caso de SV40, un virus de DNA que tiene el potencial de causar tumores, su infectividad se ve disminuida cuando se trata a las células con drogas como la nistatina, que inhiben esta vía [86]. Asimismo, la expresión de una mutante dominante negativa de dinamina (defectuosa en su actividad de GTPasa) inhibe la entrada de este virus [24] lo que sugiere que SV40 entra a la célula por una vía dependiente de caveolina y dinamina. Continuando la caracterización de la vía de entrada de este virus, Pelkmans *et al*, demostraron que inhibidores de tirosin cinasas, como la genisteína, bloquean la internalización de este virus [24]. Además, SV40 requiere un citoesqueleto de actina dinámico dado que inhibidores de la polimerización de actina afectan su infectividad [24]. La ruta de entrada de SV40 es poco común,

después de ser internalizado por la vía dependiente de las caveolas, el virus es transportado a organelos celulares neutros llamados caveosomas y de ahí al retículo endoplasmático, en donde la partícula viral es desensamblada por enzimas de la maquinaria del plegamiento de proteínas [89, 90]. Al ser un virus de DNA, el sitio de replicación de este virus es el núcleo de la célula. Aún se desconoce el mecanismo que utiliza este virus para llegar hasta este organelo.

Dentro de los virus que entran por macropinocitosis está el virus vaccinia (Figura 5) [30]. Recientemente, Mercer *et al*, siguieron la entrada de vaccinia *in vivo* usando tanto partículas virales como proteínas celulares marcadas fluorescentemente y mostraron que este virus se asocia a filopodios, estructuras tipo dedo formadas por el citoesqueleto de actina que se proyectan del cuerpo de la célula. Siguiendo el virus marcado, los autores vieron que este virus utiliza este tipo de estructuras para acercarse al cuerpo de la célula y una vez en la membrana plasmática, el virus es literalmente engullido. Inhibidores del citoesqueleto de actina, tratamientos con amilorida que es un inhibidor de los intercambiadores Na^+/H^+ y mutantes dominantes negativas de Rac1 y PAK1 reducen su entrada [30].

En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus envuelto con genoma de RNA, se ha reportado que entra por diferentes vías dependiendo del tipo de célula. Sin embargo, la macropinocitosis ha sido sugerida como el mecanismo de entrada que utiliza para infectar a los macrófagos humanos [91]. Esta observación se sustenta en la presencia del virus en macropinosomas detectado por microscopía electrónica, y la inhibición de su entrada por drogas que evitan la formación de ruffles (extensiones de membrana generadas por la remodelación del citoesqueleto de actina), tales como amilorida [91].

Otras vías de endocitosis menos caracterizadas también son utilizadas por los virus. Por ejemplo, el poliomavirus murino entra a las células por una vía independiente de clatrina, dinamina y caveolina [92]. Además, el norovirus murino 1, un virus causante de gastroenteritis, entra por una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina [54]. Mediante el uso de agentes químicos y mutantes dominantes negativos también fue excluida la macropinocitosis como mecanismo de entrada para este virus.

Rotavirus, un virus del cual se hablará con más detalle más adelante, entra a las células por una vía similar a la de poliomavirus sin embargo, los rotavirus sí requieren que la GTPasa dinamina sea funcional [93].

Los virus pueden entrar a la célula utilizando diferentes rutas

Originalmente se pensaba que los virus utilizaban una sola vía de entrada para infectar diferentes tipos celulares. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que un mismo virus puede entrar por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular, e inclusive utilizar rutas alternativas o paralelas en la misma célula [39, 80, 94].

Como se mencionó anteriormente, el representante típico de la endocitosis mediada por clatrina es el virus de influenza [80]. Sin embargo, se ha encontrado que en células HeLa este virus no es afectado por drogas o mutantes dominantes negativos que inhiben tanto las vías de endocitosis mediadas por clatrina, como la mediada por caveolina, sugiriendo que el virus de influenza puede entrar también por una vía independiente de clatrina y caveolina (Figura 5) [94]. Virus que entran por la endocitosis mediada por caveolas como SV40 también pueden tener otras vías de entrada [89]. En

el 2005, Damm *et al*, demostraron que este virus puede entrar a células que carecen de caveolina y utilizar una vía que es independiente tanto de caveolina como de clatrina, y de dinamina (Figura 5) [39]. A pesar de utilizar diferentes mecanismos de endocitosis para ser internalizado, SV40 mantiene su dependencia por el colesterol y el requerimiento por las cinasas de tirosina en ambas vías de entrada [39, 89].

Entrada de rotavirus a la célula

Generalidades

En el laboratorio estamos interesados en la caracterización del mecanismo de entrada de rotavirus un virus causante de diarrea en niños menores de 5 años y en infantes de otras especies de mamíferos [95]. Anualmente, las infecciones por rotavirus resultan en más de 2 millones de hospitalizaciones y alrededor de 500,000 muertes en niños menores de 5 años de edad [95]. Los síntomas que se presentan durante la infección son diarrea severa, vómito y fiebre. La mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la fuerte deshidratación que provoca la infección por lo que es muy importante mantener hidratados a los niños.

Rotavirus, miembro de la familia *Reoviridae*, se caracteriza por carecer de una envoltura lipídica y por estar formado por tres capas concéntricas de proteína (estructura llamada TLP por sus siglas en inglés: triple layered particle, Figura 6). La cápside viral rodea al genoma compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena el cual codifica para 6 proteínas no estructurales (denominadas NS por proteína viral no estructural) y 6 proteínas estructurales (llamadas VP por proteína viral). Las proteínas no estructurales se encuentran en las células infectadas pero no forman parte de la

partícula viral madura y son importantes para la replicación y morfogénesis de rotavirus. Las proteínas estructurales constituyen la partícula viral y tienen diferentes funciones: la proteína VP1 es la RNA polimerasa viral que funciona como la transcriptasa y la replicasa del genoma viral, la proteína VP2 es necesaria para la actividad de replicasa de VP1 mientras que VP3, a través de su actividad de metiltransferasa, se encarga de poner el CAP a los mensajeros virales [96]. En conjunto, las proteínas VP1, VP2 y VP3 forman la capa más interna de la partícula viral (Figura 6). La capa intermedia está constituida por la proteína viral VP6 la cual tiene un papel clave en la estructura del virion por sus interacciones con la proteína VP2 y con las proteínas de la capa más externa VP4 y VP7, proteínas involucradas tanto en la unión como en la entrada de rotavirus (Figura 6). La proteína VP4 está implicada no sólo en la unión y la penetración celular sino también en la hemaglutinación, neutralización y virulencia de este virus [96]. Se ha encontrado que el procesamiento enzimático de la proteína VP4 con tripsina incrementa la infectividad de rotavirus. Sin embargo, el mecanismo por el cual este corte proteolítico activa la infectividad del virus aún no se conoce. La otra proteína de la capa externa, la glicoproteína viral VP7, interactúa también con los receptores celulares de rotavirus después de la unión inicial del virus con la superficie celular [97]. Además, VP7 es una proteína que une calcio y al hacerlo, estabiliza la capa externa de la cápside viral. Quelantes de calcio liberan las proteínas de la capa más externa, quedando la partícula de doble capa o DLP (por sus siglas en inglés, double-layered particle), la cual es transcripcionalmente activa.

In vivo, rotavirus infecta primordialmente a los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado en la línea celular MA104

que proviene de epitelio de riñón de mono, en donde diferentes cepas de rotavirus se replican eficientemente [97].

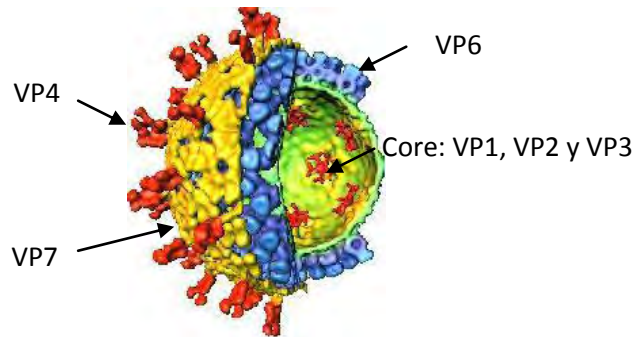


Figura 6. Reconstrucción tridimensional de rotavirus a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. Se pueden observar las tres capas concéntricas de la partícula viral. La capa interna está formada por las proteínas virales VP1, VP2 y VP3, la capa intermedia está compuesta por la proteína viral VP6 mientras que la capa externa está formada por las proteínas VP7 y VP4. Esta última es la que forma las espículas del virus. Modificada de Jayaram H *et al* [96].

El ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular. Después de que el virus entra (ver más adelante), pierde las proteínas de la capa más externa generando la partícula de doble capa que, como se mencionó previamente, es transcripcionalmente activa (Figura 7). Esta DLP sintetiza los RNA mensajeros que pueden ser utilizados para traducción o como molde para generar el RNA de doble cadena (dsRNA). La síntesis de dsRNA, el ensamble de los cores y las DLPs ocurre en inclusiones electrodensas llamadas viroplasmos que se forman en el citoplasma debido a la infección [98]. Las partículas de doble capa o DLPs geman de los viroplasmos hacia el interior del retículo endoplasmático (RE), organelo donde continúa la morfogénesis y maduración de rotavirus. Es en la membrana de este organelo donde se encuentran insertadas las proteínas virales VP7 y NSP4 (sintetizadas por los ribosomas asociados a este organelo). La proteína viral NSP4 participa en la captura de las DLPs que geman del viroplasma ya que posee afinidad por la proteína VP6 en su

extremo citosólico. En el RE se forma un intermediario que consiste en las DLPs rodeadas por una envoltura lipídica temporal y con las proteínas VP4, VP7 y NSP4 asociadas a ella. Durante el proceso de morfogénesis, la envoltura lipídica y NSP4 se pierden por un mecanismo aún desconocido, y las DLPs retienen selectivamente a las proteínas VP4 y VP7 las cuales se ensamblan para formar la tercera capa del virus (Figura 7). Finalmente, las partículas maduras con las tres capas de proteína (TLP, Figura 6) son liberadas de la célula mediante lisis (Figura 7).

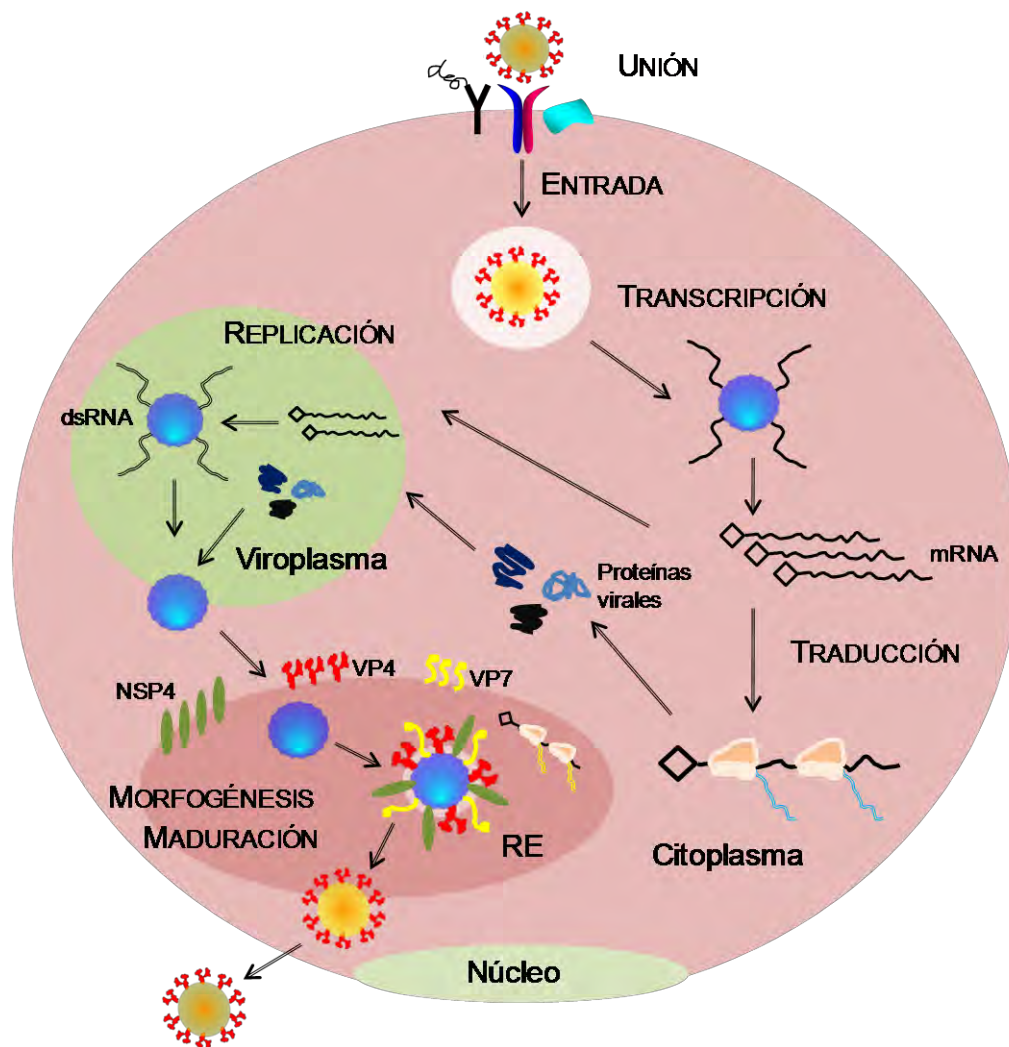


Figura 7. Ciclo replicativo de los rotavirus. Se muestran las principales etapas del ciclo desde que rotavirus se une a sus receptores celulares y entra a la célula hospedera hasta que las nuevas partículas son liberadas mediante lisis celular.

Interacciones tempranas de rotavirus con su célula hospedera

Para entrar a la célula, los rotavirus requieren de varios pasos (Anexo 2 y Figura 8) [99]. El primero, es su activación por tripsina en donde la proteína VP4 se corta específicamente en dos polipéptidos de menor peso molecular llamados VP5 y VP8. Una vez activado, el virus se une a la célula blanco a través del reconocimiento de receptores presentes en la superficie celular. La presencia de dichos receptores determina, en gran medida, que tipo celular puede infectar un virus. Se sabe que para los rotavirus, el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ y la proteína de choque térmico Hsc70 están involucradas como sus receptores (Figura 8).

Con respecto al ácido siálico, la interacción de rotavirus con este receptor se da a través del dominio VP8 de VP4 [100]. Se sabe que no todas las cepas de rotavirus requieren interactuar con esta molécula (Tabla 2). Tratamientos con neuraminidasa, una enzima que corta los ácidos siálicos terminales, afecta la infectividad de algunas cepas de rotavirus. A estas cepas se les llama sensibles a neuraminidasa. Existen cepas que no son sensibles a este tratamiento y se les conoce como resistentes a neuraminidasa (Tabla 2).

Por otra parte, como se mencionó previamente, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ están implicadas como receptores de rotavirus tanto para las cepas sensibles como para las resistentes a neuraminidasa (Tabla 2). Las proteínas virales VP4 y VP7 tienen varios sitios de unión a integrinas [101, 102]. Mediante ensayos de bloqueo usando péptidos que mimetizan los sitios de unión a las integrinas o anticuerpos contra éstas, se ha demostrado que rotavirus interactúa con estas proteínas [97, 103]. Sin embargo, al igual que con el ácido siálico, existen cepas de rotavirus que no utilizan

estas integrinas como receptores, pero pudieran utilizar otra u otras moléculas diferentes aún no caracterizadas (Tabla 2).

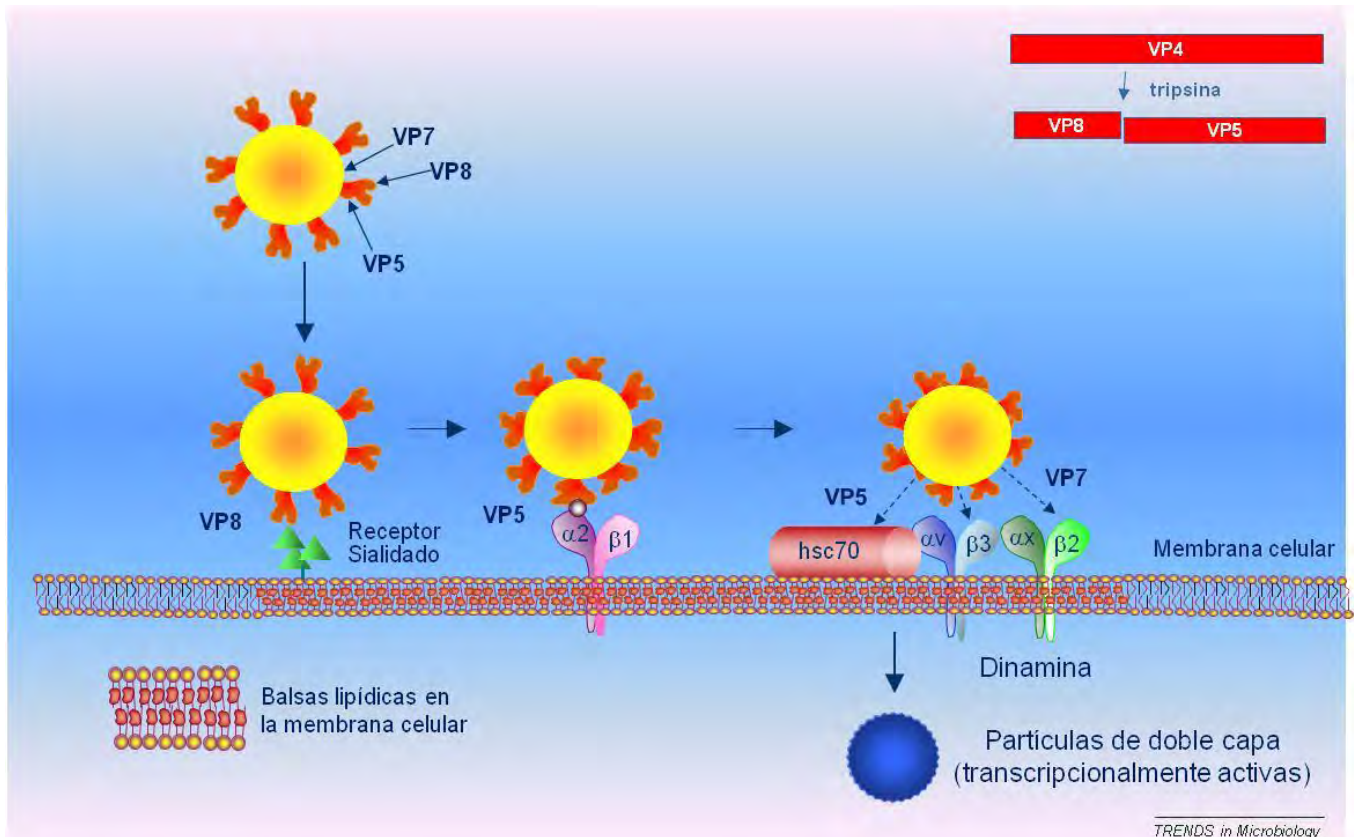


Figura 8. Primeros pasos en la infección de la cepa de rotavirus RRV. Los rotavirus requieren de un procesamiento proteolítico para ser infecciosos. Una vez procesada la proteína VP4, el virus se une específicamente a sus receptores celulares. La unión a los receptores celulares provoca cambios conformacionales en la partícula viral que facilitan la entrada del virus. Modificada de López S & Arias CF [104].

Por último, también se ha encontrado que la proteína de choque térmico Hsc70 juega un papel importante como receptor para rotavirus. Esta proteína actúa como un receptor post-unión para las cepas de rotavirus sensibles y resistentes a neuraminidasa [105].

En la entrada de rotavirus a la célula también se ha sugerido que las balsas lipídicas juegan un papel importante, ya que la infectividad viral sufre una severa disminución al remover el colesterol de

la membrana (lo que resulta en la desestabilización de estos microdominios lipídicos) [93, 106]. La presencia de las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$, de la proteína Hsc70, así como de las partículas virales infecciosas en éstas balsas lipídicas, apoyan la idea de que éstas son importantes en la entrada de rotavirus [107].

Tabla 2. Clasificación de distintas cepas de rotavirus da acuerdo a sus requerimientos de integrinas y de ácido siálico

Cepa (Origen)	Neuraminidasa	Integrina	Referencias
RRV (Simio)	Sensible	Dependiente	[97, 108, 109]
TFR (Porcina)	Sensible	Independiente	[97, 108]
Wa (Humano)	Resistente	Dependiente	[97, 109, 110]
UK (Bovino)	Resistente	Independiente	[97, 108]

Una vez que el virus ha reconocido a sus receptores en la superficie celular, el siguiente paso es la penetración de la membrana plasmática. En el caso de rotavirus, aún no se ha definido el mecanismo preciso que utiliza este virus para entrar a la célula. Algunos autores han sugerido que el virus puede entrar por penetración directa de la membrana plasmática [111], mientras que estudios de microscopía electrónica sugieren que el virus entra por endocitosis. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos demostrado mediante el uso de drogas y de mutantes dominantes negativas (de eps15, caveolina-1 y dinamina-2), que la entrada de la cepa de rotavirus RRV es independiente tanto

de la endocitosis mediada por clatrina como la de caveolina y sin embargo, depende de dinamina, una proteína involucrada en la escisión de la vesícula de la membrana plasmática [93].

Dado que se ha encontrado que distintas cepas de rotavirus provenientes de diferentes huéspedes animales tienen distintos requerimientos por los receptores celulares, en este trabajo se evaluó si estas diferencias marcaban distintas preferencias en la vía de endocitosis utilizada por estos virus (Tabla 2). Además, para estudiar los pasos posteriores a la entrada del virus, caracterizamos el papel de proteínas involucradas en el tráfico vesicular sobre la infectividad viral.

IV. Objetivo general

- Caracterizar el mecanismo de entrada de los rotavirus a las células MA104 utilizando la cepa de simio RRV y comparar la entrada de esta cepa con la de otra cepa que presenta distintos requerimientos de los receptores celulares.

V. Objetivos particulares

- Establecer cuáles proteínas celulares involucradas en las distintas vías de endocitosis, participan en la entrada de los rotavirus
- Comparar la vía de entrada y las proteínas celulares requeridas por la cepa de simio RRV con otra (s) cepa (s) de rotavirus que tengan diferentes requerimientos por los receptores celulares
- Caracterizar las proteínas celulares que participan en el tráfico intracelular de rotavirus

VI. Materiales y métodos

Células y Virus. La línea celular de epitelio de riñón de mono rhesus MA104 fue crecida en medio DMEM Advance (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) suplementado con 3% de suero bovino fetal. Los rotavirus de simio rhesus RRV y de humano Wa fueron obtenidos de H.B. Greenberg (Universidad de Stanford en Stanford, California). La cepa porcina TFR fue conseguida con I. Holmes (Melbourne, Australia) y la cepa bovina UK fue donada por D.R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, UK). Todas las cepas de rotavirus fueron crecidas como se describió previamente [112]. Partículas de doble capa (DLPs) de diferentes cepas fueron purificadas en gradientes de densidad de CsCl, como ya se ha reportado [113]. El reovirus tipo 1 fue obtenido de C. Ramos (Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos). El virus de simio 40 (SV40) fue donado por L. Gutiérrez (Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos).

Anticuerpos y reactivos. Se utilizaron tres anticuerpos policlonales contra rotavirus. Uno contra la partícula viral completa (α -TLPs), otro dirigido contra una proteína viral llamada NSP2 y otro específico para la cepa humana Wa (α -Wa). Los tres anticuerpos fueron producidos en conejo en nuestro laboratorio, al igual que los anticuerpos policlonales de conejo contra reovirus y contra las proteínas vimentina y dinamina-2. Los anticuerpos monoclonales (mAb) contra la cadena pesada de clatrina, hsc70 y hsp70 fueron adquiridos de ABR Antibodies (Golden, CO, USA). Los anticuerpos policlonales dirigidos contra Rab5a y Rab5b, los mAbs contra el antígeno grande de SV40 (anti-SV40Tag), anti-HA, Arf6, Cdc42, Flotilina-1 y RhoA fueron comprados a Santa Cruz (Santa Cruz, CA). El mAb de Flotilina-1 fue adquirido de BD Biosciences (San Diego, CA, USA), el mAb Rab7a fue comprado a Abcam (Cambridge, MA, USA) y el mAb de Rab9a fue comprado a GeneTex (Irvine, CA, USA). La sacarosa, bafilomicina A1, metil- β -ciclodextrina, DMA [5-(N,N-Dimethyl) amiloride 121 hydrochloride], acrilamida, nocodazol, citocalasina D, el colesterol soluble en agua y el kit para la determinación de actividad

de la deshidrogenasa láctica fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, Mo.). El kit de clonación TOPO TA con el vector pCR 2.1-TOPO, el anticuerpo conejo anti-ratón peroxidasa, el dextran acoplado a tetrametilrodamina (40KDa), la transferrina conjugada a Alexa 546, la subunidad B de la toxina de cólera conjugada a Alexa 488 y los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 y 568 fueron comprados a Invitrogen (California, USA). El anticuerpo policlonal cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa fue de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA). Los kits para transcripción in vitro MEGAscript T7 y MEGAscript SP6 fueron adquiridos de Ambion (Foster City, CA, USA). La proteína A conjugada con peroxidasa y la resina Q-sefarosa fast flow fueron compradas a GE Healthcare (Seúl, Corea del Sur).

Cinética de entrada de rotavirus. Para medir la velocidad de entrada de rotavirus a la célula, monocapas confluentes de células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos fueron lavadas dos veces con MEM frío y enfriadas en hielo. Posteriormente, se agregaron 2000 FFUs (unidades formadoras de focos) de cada cepa de rotavirus por pozo y se permitió que los virus se pegaran a las células por 1h en hielo. Después de este tiempo, los virus no unidos fueron lavados y posteriormente se permitió su entrada al agregar MEM e incubar las cajas a 37°C. A los tiempos indicados, el medio de los pozos fue aspirado y las partículas virales todavía presentes en la superficie celular fueron despegadas con dos lavados rápidos con 3mM de EGTA en PBS, seguida por una incubación con MEM a 37°C. Después de alcanzar el último punto de medición de la entrada (90min), las cajas fueron colocadas en la incubadora y se dejó proceder la infección por 15h. Las células fueron fijadas y teñidas como se describe más adelante. La cantidad de virus que entró en cada tiempo fue normalizado con la cantidad de virus que entró cuando no se realizó el lavado con EGTA y que fue tomado como el 100% de entrada.

Ensayos de Infectividad. Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 96 pozos fueron lavadas dos veces y pre-tratadas a 37°C con bafilomicina, citocalasina D y metil- β -ciclodextrina (por 1h), con

acrilamida, cloruro de amonio, nocodazol y DMA (por 30min) o con sacarosa (por 10min) a las concentraciones indicadas en cada ensayo, todos los reactivos fueron disueltos en MEM. Después del tratamiento correspondiente, las células fueron infectadas con 2000 unidades formadoras de focos (FFUs) por pozo de reovirus o de las cepas de rotavirus (Wa, UK, TFR y RRV), en presencia del tratamiento correspondiente durante 1h a 37°C (con la excepción de metil- β -ciclodextrina, M β CD). Después de este periodo, el inoculo viral fue retirado. El virus que no fue internalizado durante este tiempo, se desprendió de la superficie celular con dos lavados rápidos con 3mM de EGTA en PBS y la infección se dejó proceder por 15h. En el caso de reovirus, éste fue neutralizado con un anticuerpo policlonal (1:500) que fue incubado durante 15min después del período de adsorción. La infección se dejó proceder por 15 horas post-infección (hpi). En el caso del tratamiento con M β CD, en paralelo se realizaron ensayos de restitución de colesterol. En estos experimentos, las células fueron tratadas con M β CD como se menciona previamente por 1h. Posteriormente, las células fueron lavadas y se agregaron 100 μ g/ml de colesterol por pozo por 1h a 37°C. Las células fueron lavadas nuevamente e infectadas con las cepas de rotavirus como ya se ha mencionado. Finalmente, las células fueron lavadas y a las 15hpi, fueron fijadas y procesadas en un ensayo de detección de focos con inmunoperoxidasa usando anticuerpos policlonales. Brevemente, las células fueron fijadas y permeabilizadas con acetona al 80% en PBS por 15min. Después de ese lapso, fueron lavadas con PBS tres veces y fueron incubadas con un anticuerpo anti-Rotavirus (anti-TLPs) diluido 1:2000 (en el caso de las cepas RRV, UK y TFR), mientras que las células infectadas con la cepa Wa fueron incubadas con un anticuerpo anti-Wa diluido 1:1000 por 1h a 37°C. En el caso de las células infectadas con reovirus, éstas fueron incubadas con un anticuerpo anti-reovirus diluido 1:2500. Después de este periodo, las células fueron lavadas con PBS tres veces, e incubadas con proteína A acoplada a peroxidasa (1:3000), por 1 h a 37°C. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente con PBS tres veces y se adicionó el sustrato de la peroxidasa (carbazol y peróxido de hidrogeno), hasta ver el desarrollo de color. Se lavó con agua para detener la reacción [114]. Las unidades formadoras de focos (FFUs) fueron contadas en un microscopio

Invertido (Nikon Diaphot 300 automático, Japón) provisto de una cámara COHU color CCD y software Visiolab 1000. Ninguno de los tratamientos realizados causó muerte celular, esto se determinó por inspección morfológica y por ensayos de exclusión de azul de tripano.

Bloqueo de la infección de rotavirus con anticuerpos monoclonales contra hsc70. Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos fueron lavadas dos veces con MEM y diferentes concentraciones de MAbs contra hsc70 (MA3-006), o contra hsp70 (MA3-009) fueron agregadas a las células por 90min a 37°C. Después de esta incubación, los MAbs fueron retirados y las células fueron infectadas con las diferentes cepas de rotavirus (2,000 ffu por pozo) por 1h a 37°C. Después de este período de absorción, el inoculo viral fue removido, las células fueron lavadas dos veces con MEM y se dejó proceder la infección por 15h. Las células fueron fijadas y procesadas para determinar la infectividad como se describió anteriormente.

Ensayos de transfección de plásmidos. Las células crecidas en cubreobjetos de 10mm de diámetro a un 70% de confluencia, fueron transfectadas con los diferentes plásmidos usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) de acuerdo al protocolo del proveedor. Las células fueron transfectadas 48h antes de la infección viral. Los plásmidos usados fueron los siguientes: para la proteína Eps15 se utilizaron el plásmido control pD3Δ2 (Eps15 control) que expresa una versión truncada de Eps15 que funciona como la proteína silvestre y la construcción pEΔ95/295 (Eps15 mutante), la cual codifica una proteína mutante de Eps15 que carece del segundo y tercer dominio EH [53]. Estos plásmidos fueron donados por A. Benmerah (INSERM, Paris, Francia). Ambas construcciones están fusionadas con la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) en su N-terminal. Para caveolina se utilizaron los vectores pCINeo/IRES-GFP/caveolina-1 y pCINeo/IRES-GFP/caveolina-1 DN, plásmidos bicistrónicos que expresan GFP y la forma silvestre de caveolina-1, o una caveolina-1 mutante dominante negativa en la cual los residuos 1 al 81 fueron removidos, respectivamente.

Estos vectores fueron otorgados por J.Eggermont, (Katholieke Universiteit, Lovaina, Bélgica). Los plásmidos pCDNA3.1/Dyn2 (*wt*) y pCDNA3.1/K44A (K44A), los cuales expresan la dinamina 2 silvestre fusionada en su amino terminal con un epítopo de hemaglutinina (HA) y la mutante dominante negativa también fusionada a HA, respectivamente, fueron proporcionados por S.L. Schmid (Scripps Research Institute, La Jolla, California). Para la proteína Cdc42, las construcciones que expresan la forma silvestre (Cdc42 *wt*), la mutante dominante negativa N17 (Cdc42 N17 o DN) y la mutante constitutivamente activa V12 (Cdc42 V12 o CA), todas clonadas en el vector EGFP-C1, fueron donadas por Francisco Sánchez-Madrid (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España) [115]. La expresión de Caveolina, Cdc42 y Eps15 (tanto la forma silvestre como la mutante y en el caso de Cdc42 también la forma constitutivamente activa) fue detectada mediante la expresión de GFP, mientras que la expresión de dinamina y su dominante negativa fueron monitoreados usando un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta HA.

Expresión y purificación de la RNasa III. Bacterias BL21D3 transformadas con el plásmido (vector pGEX4TI) que codifica para la RNasa fusionada a GST en su N-terminal (clonada por M Arias en nuestro laboratorio) se crecieron a 37°C O/N, en presencia de ampicilina. Posteriormente, este cultivo se utilizó para inocular 250 ml de LB. Este cultivo se incubó a 30°C por 3h. Pasado este tiempo, se indujo la expresión de la enzima con la adición de 1mM de IPTG y se incubó a 30°C por 2h más, todas las incubaciones se hicieron con agitación. A continuación, el cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 20min y la pastilla fue resuspendida en el buffer de unión A1 (20mM Na₃PO₄, 0.15M NaCl pH 7.3), se adicionaron inhibidores de proteasas y la pastilla fue sonicada. Posteriormente, se añadió una solución de Tritón X-100 al 20% y se incubó 30min a temperatura ambiente (TA) con agitación ocasional. El lisado se centrifugó a 9000 rpm por 15min, y el sobrenadante se volvió a centrifugar para limpiar los posibles restos celulares. Este sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se procedió a su purificación por cromatografía de afinidad en el AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ, USA) utilizando una columna de glutatión-sefarosa. La enzima fue eluida en el buffer de elución (50mM Tris-HCl, 10mM Glutatión pH 8). La presencia y tamaño de la proteína purificada (50KDa) fue verificada por un gel SDS-PAGE. La enzima fue dializada en el buffer de diálisis (20mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 2.7mM KCl, 0.5mM EDTA, 140mM NaCl, 30% glicerol, 1mM DTT pH 7.9) por 24h a 4°C con agitación con un cambio de buffer a las 12h. La enzima fue alicuotada y almacenada a -20°C. La actividad de la enzima fue evaluada con un dsRNA producido en el laboratorio, como se describe más adelante.

Producción de esiRNAs. Se montó la técnica de la producción de los esiRNAs (endoribonuclease-prepared small interference RNAs) la cual fue clave para lograr la inhibición de la expresión de las proteínas de interés para este trabajo. La mayor parte de la metodología está basada en los artículos de Kittler R [116, 117]. Brevemente, a partir de RNA total extraído de células MA104, se amplificó la región de los diferentes genes seleccionados, empleando oligos específicos diseñados por nosotros, o los ya reportados en la base de datos RIDDLE (<http://cluster-12.mpi-cbg.de/cgi-bin/riddle/search>). Los oligos utilizados tienen en el extremo 5' parte de la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7 que se utiliza para la producción del RNA de doble cadena (dsRNA). Una vez obtenido el producto de PCR, se realizó otra ronda de PCR pero ahora con oligos que tienen la secuencia promotora completa de la RNA polimerasa T7. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de transcripción in vitro utilizando el kit MEGAscript T7 (de acuerdo al protocolo del proveedor) para generar dsRNA de cada uno de los genes seleccionados. Los dsRNA fueron incubados con la RNasa III para obtener fragmentos de ~21pares de bases (esiRNAs). Generalmente, 4µg de RNasa III purificada como se describió anteriormente y una incubación por 20min a 25°C fue suficiente para generar los esiRNAs. Una vez obtenidos los esiRNAs, fueron purificados por cromatografía de intercambio iónico con la resina Q sefarosa (de acuerdo al protocolo del proveedor) y cuantificados por espectrofotómetro. Por otra parte, los productos de PCR obtenidos de los diferentes genes, fueron clonados en el vector TOPO TA 2.1 (Invitrogen California USA) para

tener un control en la secuencia. Además de producir los esiRNAs de los genes de arf6, cdc42, rab5a, rab5b, rab5c y rhoa; se produjeron esiRNAs control, para lo que se utilizó el vector comercial pGEMLuc (Promega, Madison WI USA) el cual tiene el gen de luciferasa flanqueado por las secuencias promotoras de las RNA polimerasas T7 y SP6. El gen de luciferasa fue digerido con enzimas de restricción para tener un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases para su posterior digestión con la RNasa III. Cada cadena fue transcrita por separado con los kits de MEGAscript T7 y SP6 y después se hibridaron para generar el dsRNA el cual fue cortado por la RNasa III, purificado y cuantificado bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

Posteriormente, se procedió a evaluar la eficiencia del silenciamiento de los esiRNAs mediante su transfección a las células. Además, se verificó que los esiRNAs no fueran tóxicos para las células mediante la medición de la liberación de LDH al medio y un marcaje metabólico con S^{35} . Al comparar los resultados obtenidos con los esiRNAs versus los siRNAs comerciales, los resultados fueron muy similares, confirmando que los esiRNAs funcionan de manera eficiente. Por esta razón, los resultados que se muestran en este trabajo son el conjunto de datos obtenidos utilizando ambos interferentes.

Transfección reversa de interferentes. Un siRNA contra la proteína verde fluorescente o luciferasa fue usado como un control irrelevante. La transfección de siRNAs a las células MA104 fue realizada de la siguiente manera: se preparó una mezcla de 15 μ l de oligofectamina (Invitrogen) en 1ml MEM y se incubó por 10min a temperatura ambiente. Los siRNAs diluidos en 15 μ l MEM, se agregaron a los pozos de una caja de cultivo celular y posteriormente se adicionó la mezcla de oligofectamina. Esta mezcla fue incubada por 20min a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 200 μ l de una suspensión con 0.5×10^5 células/ml por pozo y se incubó a 37°C durante 72h. A este tiempo, la mezcla de transfección se retiró y las células se lavaron dos veces con MEM. Ninguna de las transfecciones causó muerte celular, esto determinado por inspección morfológica, exclusión de azul de tripano y liberación de LDH.

Lipofección de DLPs. Las células transfectadas con los siRNAs fueron lipofectadas con DLPs de las diferentes cepas de rotavirus. Las DLPs fueron diluidas en MEM e incubadas con una mezcla de lipofectamina (Invitrogen) en MEM por 20min a temperatura ambiente. La mezcla fue adicionada a las células por 1h a 37°C, y las células fueron lavadas con MEM. A las 15hpi las células fueron fijadas y las células infectadas fueron detectadas por tinción con peroxidasa como se describió previamente.

Ensayo de la deshidrogenasa láctica. Las células crecidas en cajas de 96 pozos y transfectadas durante 72h con los diferentes interferentes, fueron lavadas dos veces con MEM. Siete horas después el medio celular fue colectado y la actividad de LDH fue determinada con un kit comercial, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Marcaje metabólico. Las células crecidas en cajas de 48 pozos y transfectadas con los diferentes esiRNAs, fueron lavadas e incubadas con MEM sin metionina durante 30min. Posteriormente, se incubaron durante 2h más con medio sin metionina suplementado con 25µCi/ml de Easy Tag Express (³⁵S). Después de esta incubación, las células se lisaron como se indica en la sección de Inmunoblots, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por autoradiografía.

Internalización de marcadores celulares. Las células fueron lavadas dos veces con MEM y pre-tratadas con los diferentes reactivos como se indica en los pies de figuras. Posteriormente, se agregaron 0.5mg/ml de Dextran, 1µg/ml de toxina de cólera o 50µg/ml de transferrina por 1h a 4°C, en presencia del reactivo. Al finalizar la incubación, las células se lavaron y se adicionó medio a 37°C para permitir la entrada del marcador celular. Para eliminar la señal de transferrina unida a la superficie celular, las células fueron lavadas antes de ser fijadas con

PBS a pH 5, seguido de otro lavado con PBS pH 7. Finalmente, las células se procesaron para inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia. Las células MA104 crecidas en cubreobjetos y transfectadas con plásmidos o con siRNAs, fueron infectadas con las diferentes cepas de rotavirus a una multiplicidad de infección (moi) de 3. Como control se utilizaron SV40 y reovirus tipo 1. Los diferentes virus fueron absorbidos por 1h y después de este tiempo, el inoculo viral fue retirado y se agregó MEM sin suero. La infección se dejó proceder por 6h. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS por 20min y después fueron lavadas 3 veces. Las células fueron permeabilizadas con Tritón 0.5% en buffer de bloqueo (BSA 1%, 50mM NH₄Cl en PBS) por 15 min y después de 3 lavados, las células fueron incubadas por toda la noche a 4°C con buffer de bloqueo. Después de este lapso, las células fueron lavadas una vez e incubadas con los anticuerpos indicados en cada figura por 1h. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas 3 veces por 5min e incubadas con los anticuerpos secundarios indicados en cada figura por 1h. Después de esta incubación, las células fueron lavadas 3 veces por 5min y finalmente, las células se montaron en portaobjetos utilizando Fluokeep (Argene, Verniolle, France). Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente (salvo que se indique lo contrario) y los lavados se realizaron con una solución de 50mM de NH₄Cl en PBS. Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop 2 mot plus) acoplado a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ). Las imágenes fueron capturadas digitalmente y preparadas en Adobe Photoshop 6.0.

Inmunoblots. Las células fueron lisadas en buffer de Laemmli y hervidas por 5min. Posteriormente las proteínas se separaron por SDS-PAGE y fueron transferidas a una membrana de Immobilon NC (Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en PBS o TBS e incubadas con los anticuerpos indicados.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Al finalizar la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente y las proteínas se detectaron usando el sistema Western Lightning (Perkin Elmer) exponiendo en la película hipersensible X-Omat (Kodak).

Cuantificación de mRNA de rab5c por RT-PCR. Las células MA104 crecidas en cajas de 48 pozos fueron transfectadas con el siRNA para rab5c o un siRNA control, y a las 72horas-postransfección, las células fueron lisadas con TRIzol (Invitrogen) y el RNA total fue purificado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El RNA total fue tratado con DNasa libre de RNA (Roche) para remover la posible contaminación de DNA. El nivel de mRNA de rab5c fue determinado por transcripción reversa-PCR en un solo paso. Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones son los siguientes: para el gen de rab5c se utilizaron los oligonucleótidos CAT TCC ACC TGC ACC TTT CT (left) y AGG GAA AAT GGG AGA GCA GT (right); para el gen de GAPDH los oligonucleótidos usados fueron ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA (left) y CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA T (right). La mezcla de reacción contenía lo siguiente: 250ng de RNA total (hervido por 5min y enfriado en hielo), 10µl de Sybr green master mix (2x) (Applied Biosystems), 0.1µl de transcriptasa reversa (50 U/µl) (Applied Biosystems), 0.16µl de un inhibidor de RNasa (20 U/µl) (Applied Biosystems), y 1 µl de cada oligonucleótido (2.5 pmol/µl) en un volumen total de 20µl. La amplificación se llevó a cabo en un sistema detector de secuencia ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), usando el siguiente protocolo: la transcripción reversa se llevó a cabo a 48°C por 30min, la inactivación de la transcriptasa reversa se realizó a 95°C por 10min, la muestra se amplificó por 40 ciclos de PCR de 95°C por 15s y 60°C por 1min, y la fase de disociación se llevó a cabo a 60°C a 95°C por 2min. Los resultados fueron normalizados a los niveles del mRNA de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) detectados en cada muestra.

Análisis de imágenes. Para la cuantificación de las células infectadas, las imágenes sin manipular fueron evaluadas. Los resultados mostrados son de al menos tres experimentos independientes.

Análisis estadístico. Para determinar si las diferencias observadas en los resultados eran significativas se realizó una prueba de t-student de dos colas con un intervalo de confianza del 95%.

VII. Resultados

A. Comparación de la vía de entrada de varias cepas

Dado que se ha encontrado que distintas cepas de rotavirus provenientes de diferentes huéspedes animales tienen diferentes requerimientos por los receptores celulares, decidimos evaluar si esas diferencias marcaban distintas preferencias en la vía de endocitosis utilizada por estos virus.

Para determinar si el uso de un receptor establecía una diferencia en la vía de entrada, seleccionamos cuatro cepas de rotavirus que difieren en su susceptibilidad a tratamientos con neuraminidasa y en su dependencia a integrinas. La Tabla 2 muestra las cuatro cepas que fueron utilizadas en este estudio. Parte de este trabajo fue publicado en el Journal of Virology [118]. El artículo se anexa a este escrito (Anexo 3).

Inicialmente caracterizamos si todas las cepas entraban a la célula a la misma velocidad. Para esto, las diferentes cepas virales fueron agregadas a las células a 4°C (a esta temperatura el virus se une a las células, pero que no es capaz de entrar). Al finalizar este tiempo de incubación, el virus que no se unió a las células fue lavado y el proceso de entrada fue sincronizado con la adición de medio a 37°C. A diferentes tiempos se detuvo la entrada de las partículas virales mediante lavados con EGTA (quelante de calcio) el cual libera la capa más externa de los viriones provocando que las partículas se disocian y se despeguen de la superficie celular. Después de este paso, se dejó proseguir la infección por 15h y la cantidad de virus que entró fue cuantificada mediante un ensayo de peroxidasa, como se describe en materiales y métodos. La figura 9 muestra los resultados de estos ensayos. La velocidad

de entrada de las cuatro cepas de rotavirus es notablemente diferente. RRV tiene una velocidad media de entrada de 35min, mientras que sólo el 20% de la cepa UK ha entrado a los 90 minutos post-infección. Las cepas TFR-41 y Wa, fueron intermedias en su velocidad de entrada, con una entrada media aproximada de 60 y 90min, respectivamente.

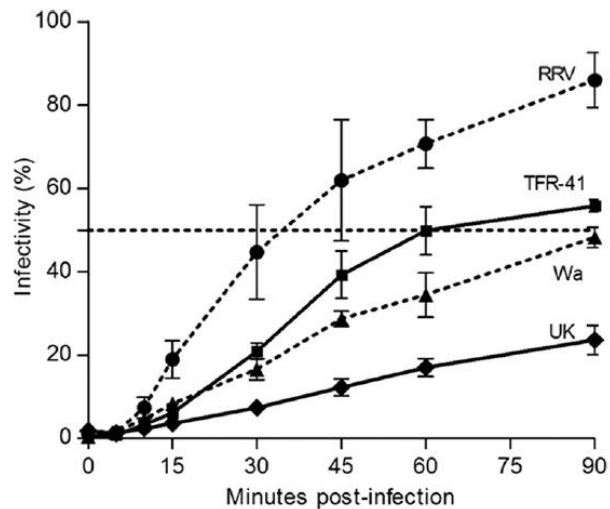


Figura 9. Cinética de entrada de rotavirus. Células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos se infectaron con las cepas de rotavirus y se permitió que los virus se unieran a las células por 1h a 4°C. Después de este tiempo, se lavaron las células y se permitió la entrada de los virus al adicionar MEM a 37°C. A los tiempos indicados, las partículas virales presentes en la superficie fueron removidas con lavados con EGTA y se permitió que la infección procediera por 15hpi a 37°C. Los datos están expresados como porcentaje del virus que no se removió con EGTA y que representa el 100%.

La infectividad de las cuatro cepas depende de la presencia de colesterol

Ya se había demostrado previamente que remover el colesterol de la membrana celular, usando agentes removedores como metil- β -ciclodextrina (M β CD) [54], resulta en una disminución severa en la infectividad de la cepa de simio RRV, su variante nar3, y la cepa humana Wa [106]. En este trabajo evaluamos el papel del colesterol sobre la infectividad de Wa, UK y TFR-41. Para

determinar si el requerimiento del colesterol (componente de las balsas lipídicas) era común en las cepas utilizadas en este trabajo, las células fueron tratadas con M β CD y el efecto en la infectividad de las cepas fue evaluado. En paralelo, se realizaron ensayos de restitución de colesterol. Encontramos que todas las cepas fueron susceptibles a la disminución de colesterol, pero este efecto se revierte cuando este componente se restituye (Figura 10). Estos resultados sugieren que las cepas de rotavirus requieren de la presencia de colesterol en la membrana plasmática y que, tal vez al igual que RRV, utilicen las balsas lipídicas como sitios para interactuar con sus receptores celulares [107].

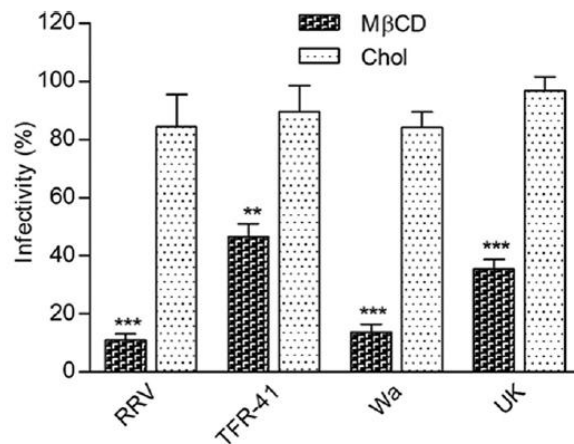


Figura 10. Remover el colesterol de la membrana plasmática disminuye la infectividad viral, al reincorporarlo la infectividad se recupera. Las células MA104 fueron pre-tratadas con 10mM de M β CD por 1h a 37°C, lavadas y 100 μ g/ml de colesterol fue agregado a algunos pozos por 1h a 37°C (Chol). Posteriormente, las células fueron infectadas. Los datos son expresados como porcentaje de infectividad con respecto al control (células no tratadas) que fue tomado como el 100%. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired t test)

Se ha reportado que tratamientos con M β CD pueden afectar de manera inespecífica algunas vías de endocitosis [55], para descartar esta posibilidad evaluamos la internalización de marcadores de una vía dependiente de caveolas y colesterol, como es la toxina de cólera, y también evaluamos la entrada de un marcador dependiente de la vía de clatrina, como es la transferrina. La figura 11

muestra que el tratamiento con M β CD afectó principalmente, la internalización de toxina de cólera y no la de transferrina, sugiriendo que en estas condiciones y en esta línea celular, la endocitosis mediada por clatrina no se afecta al remover el colesterol de la membrana plasmática.

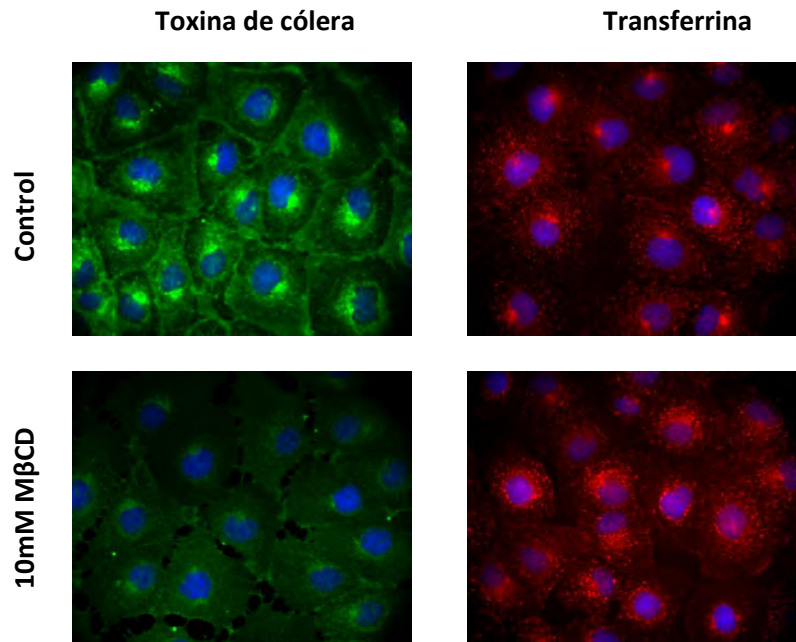


Figura 11. El tratamiento con M β CD afecta principalmente la internalización de toxina de cólera. Las células MA104 fueron pre-tratadas con 10mM de M β CD por 1h a 37°C. Posteriormente, se agregó, 1 μ g/ml de toxina de cólera conjugada a Alexa 488, o 50 μ g/ml de transferrina conjugada a Alexa 546, en presencia de M β CD, por 1h a 4°C. Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas y se adicionó medio a 37°C para permitir la entrada de ambos marcadores celulares. A los 15min, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia.

Las cuatro cepas de rotavirus analizadas interactúan con hsc70

En el laboratorio hemos demostrado previamente que la proteína de choque térmico Hsc70 tiene un papel importante como un receptor post-unión para RRV [105, 119]. En este trabajo probamos si las cepas analizadas también usaban Hsc70 durante su interacción con la superficie celular. El papel de la proteína Hsc70 fue explorado mediante ensayos de bloqueo con anticuerpos

monoclonales. En estos ensayos la monocapa celular fue pre-incubada con diferentes concentraciones de los anticuerpos monoclonales, antes de infectar con las distintas cepas de rotavirus. Los anticuerpos que se utilizaron están dirigidos contra la proteína Hsc70, o contra la proteína Hsp70 que fueron utilizados como control. Encontramos que la infectividad de las cepas Wa, TFR-41 y UK, disminuyó cerca de 30-40% cuando la infección se realizó en células pre-incubadas con el anticuerpo contra Hsc70, mientras que la infectividad de los virus cuando se utilizó el anticuerpo control contra Hsp70 no se afectó (Figuras 12A y B, respectivamente). En estas condiciones, el efecto del anticuerpo contra Hsc70 sobre la cepa de RRV obtenido fue similar a lo reportado previamente [105]. Estos resultados indican que todas las cepas utilizadas en este trabajo requieren de la presencia de Hsc70 en la superficie celular, como lo hacen las cepas RRV y Wa [105].

La acidificación de los endosomas es necesaria para la infectividad de algunas cepas de rotavirus

Dado que se ha encontrado que prevenir la acidificación de los endosomas no afecta la entrada de RRV [93, 111, 120], decidimos explorar el comportamiento de las otras cepas bajo estas condiciones. Para inhibir la acidificación de los endosomas utilizamos NH_4Cl que es una base débil que secuestra los protones de los endosomas, y bafilomicina, un inhibidor de la ATPasa vacuolar presente en los endosomas y encargada de acidificarlos [40, 121]. Para estos ensayos, las células fueron pre-incubadas con NH_4Cl , o bafilomicina, e infectadas con las diferentes cepas de rotavirus. Como se esperaba, la infectividad de RRV no se afectó por el tratamiento con NH_4Cl [93]. Interesantemente, la infectividad de las cepas TFR-41, Wa y UK sí se redujo, así como la de reovirus, que fue usado como control positivo (Figura 13). Los resultados obtenidos con la bafilomicina fueron muy similares a los de

NH₄Cl. La excepción fue la cepa de simio RRV que con este tratamiento disminuyó su infectividad ligeramente. Sin embargo, dado que la bafilomicina tiene otros efectos [122, 123] y que el tratamiento con NH₄Cl no afectó su infectividad, concluimos que esta cepa parece ser insensible (o menos sensible) a los cambios en el pH endosomal. Estos resultados sugieren que puede haber diferencias en los requerimientos por pH entre las cepas de rotavirus durante su entrada y que las cepas TFR-41, Wa y UK dependen de la acidificación de los endosomas para infectar eficientemente a las células MA104.

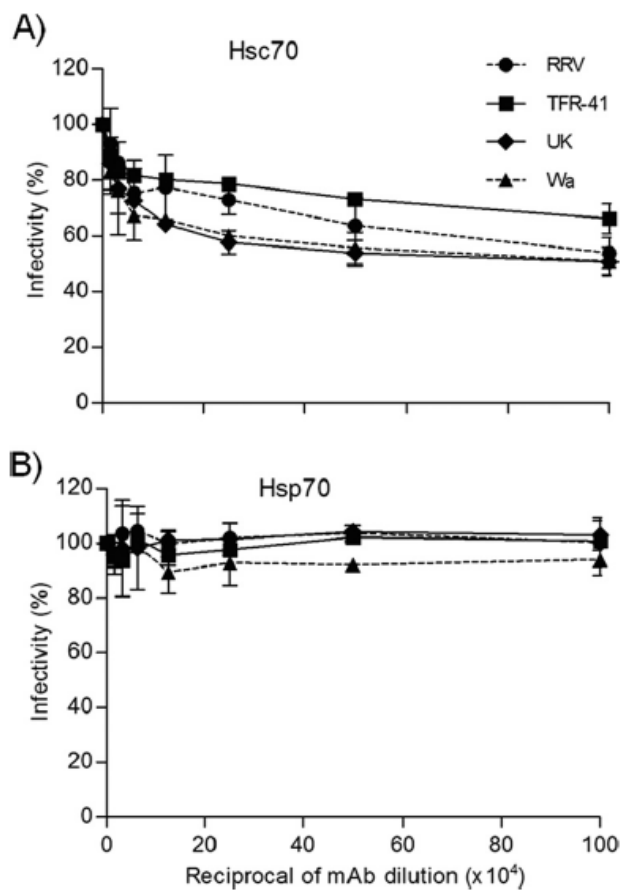


Figura 12. La infectividad de rotavirus es inhibida por un anticuerpo contra Hsc70. Anticuerpos contra Hsc70 (A) o Hsp70 (B) fueron agregados a las células MA104 por 90min at 37°C. Después de este tiempo, las células fueron infectadas y se dejó proceder la infección por 15hpi. Los datos están expresados como el porcentaje de infectividad cuando las células fueron incubadas con el control (PBS).

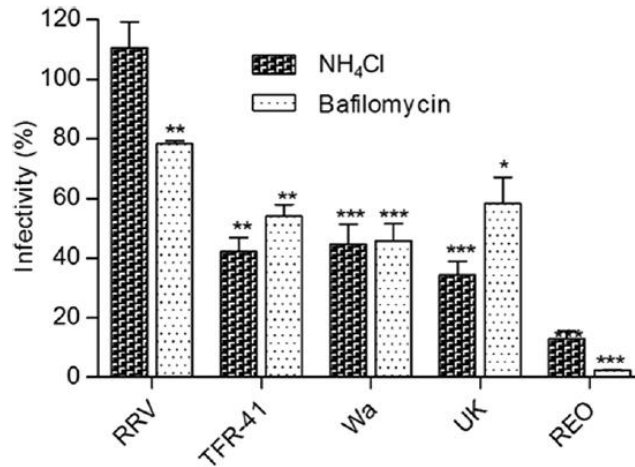


Figura 13. Efecto de la alcalinización de los endosomas en la infectividad de las cepas de rotavirus. Las células MA104 fueron pre-tratadas con 100mM de NH₄Cl o con 0.5μM de bafilomicina a 37°C por 30 o 60min, respectivamente. Posteriormente, las células fueron infectadas y los reactivos se mantuvieron durante este periodo. La infección se dejó proceder por 15h a 37°C. Los resultados están expresados como el porcentaje de infectividad observada en el control (células sin tratar). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired *t* test)

La inhibición de la macropinocitosis o de la endocitosis mediada por caveolas no disminuyen la infectividad de rotavirus

En este trabajo exploramos el papel de la endocitosis mediada por caveolas y de la macropinocitosis (dos de las vías mejor caracterizadas), en la entrada de rotavirus. La participación de la vía dependiente de caveolas fue evaluado mediante el uso de mutantes dominantes negativas. Usamos dos construcciones de caveolina-1, una que codifica para la forma silvestre y otra que expresa una mutante dominante negativa que tiene una delección de los aminoácidos 1 al 81 con lo cual esta proteína no puede asociarse a la membrana plasmática y por lo tanto, llevar a cabo su función [56]. En estas condiciones, la infectividad de las cepas de rotavirus no se afectó mientras que la infectividad del virus SV40, conocido por ingresar a la célula por la vía de las caveolas [89], si disminuyó (Figura 14). Es interesante notar que la infectividad de la cepa TFR-41 aumentó de forma ligera pero

estadísticamente significativa con la expresión de la mutante, esto sugiere que la caveolina silvestre pudiera interferir de alguna manera con la entrada de esta cepa. Ya se ha reportado previamente que las caveolas pueden regular de manera negativa la endocitosis de ciertos cargos [124], por lo que es posible que las caveolas puedan estar teniendo este efecto en la internalización de la cepa TFR-41.

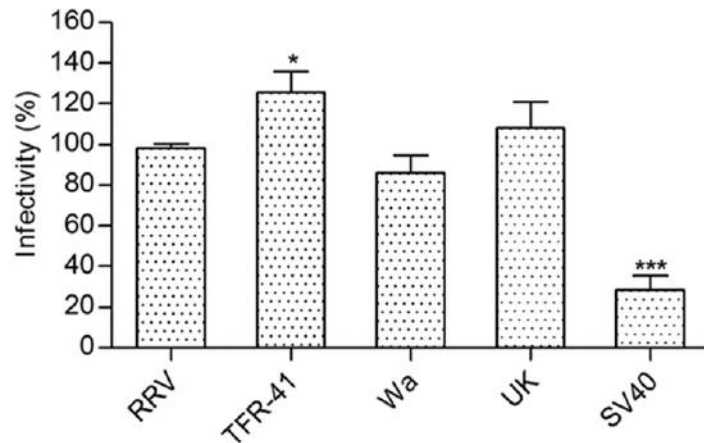


Figura 14. Bloquear la endocitosis mediada por caveolas no reduce la infectividad de rotavirus. Las células MA104 fueron transfectadas con los plásmidos que expresan la forma silvestre (*wt*) o la mutante dominante negativa de caveolina-1. Posteriormente, las células fueron infectadas con los virus y procesadas para inmunofluorescencia. La infección con rotavirus fue monitoreada usando un anticuerpo de conejo anti-NSP2 (proteína no estructural de rotavirus) mientras que la infección con SV40 fue detectada usando un anticuerpo de ratón anti-SV40TA_g, seguidos de la incubación con un anticuerpo anti-conejo o anti-ratón Alexa 568, respectivamente. Las infectividades son expresadas como porcentajes del número de células infectadas y transfectadas con la construcción de la forma *wt* ($n \geq 100$) que representa el 100%. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired *t* test).

El papel de la macropinocitosis en la entrada de las cepas virales fue evaluado mediante el uso de un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (5-(N,N-Dimethyl) amiloride hydrochloride o DMA) el cual al afectar el pH evita la activación de GTPasas como Cdc42, necesaria para inducir la remodelación del citoesqueleto de actina [29, 91]. La infectividad de ninguna de las cepas de rotavirus se afectó con este tratamiento (Figura 15A). La efectividad del inhibidor para bloquear este tipo de endocitosis en esta línea celular fue evaluada a través de ensayos de internalización de dextran, un marcador de esta

vía, obteniéndose una reducción en su entrada en las células tratadas con DMA (Figura 15B). En conjunto, estos resultados sugieren que ni la endocitosis mediada por caveolas, ni la macropinocitosis están involucradas en la vía de entrada de las cepas utilizadas en este trabajo.

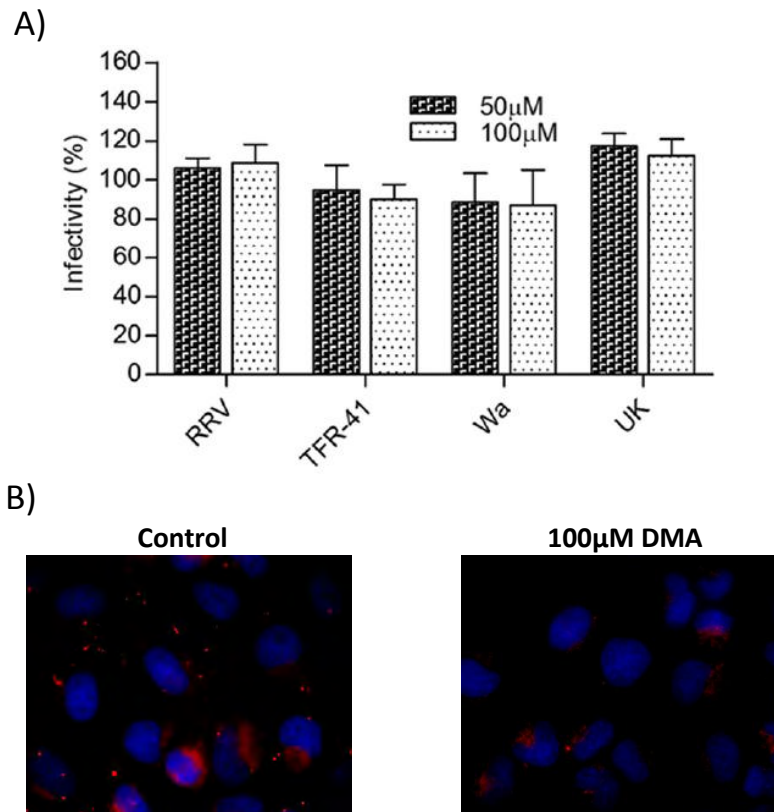


Figura 15. La inhibición de la macropinocitosis no reduce la infectividad de rotavirus a pesar de que la entrada de dextran sí se afecta. (A) Las células MA104 fueron pre-tratadas con las concentraciones indicadas de DMA a 37°C por 30min. Posteriormente, las células fueron infectadas y el reactivo se mantuvo durante este periodo. La infección se dejó proceder por 15h a 37°C. Los resultados están expresados como el porcentaje de infectividad observada en el control (células sin tratar). (B) Las células MA104 fueron pre-tratadas como se menciona en (A). Posteriormente, se agregó, en presencia de DMA, 0.5mg/ml de Dextran acoplado a tetrametilrodamina por 1h a 4°C. Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas y se adicionó medio a 37°C para permitir la entrada del marcador celular. A los 45min, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

Tratamientos que alteran la endocitosis mediada por clatrina afectan la infectividad de algunas cepas de rotavirus

En este trabajo evaluamos el papel de la vía dependiente de clatrina en la entrada de las cepas de rotavirus. El enfoque inicial fue el tratamiento de las células con un medio hipertónico (que contiene sacarosa a las concentraciones de 0.06 y 0.25M), lo que resulta en la disociación de las vesículas de clatrina de la membrana plasmática [50, 51]. En estos ensayos utilizamos como control positivo a reovirus, un virus que se conoce utiliza esta ruta para entrar a la célula [82]. Los resultados obtenidos muestran que mientras la infectividad de RRV no se afectó con los tratamientos con sacarosa, lo cual era de esperarse [93], la infectividad de las otras tres cepas y la de reovirus, disminuyó significativamente (Figura 16A). Estos resultados ilustran el hecho de que la entrada de las cepas de rotavirus puede variar y además, sugieren que la endocitosis mediada por clatrina puede estar involucrada en este proceso. La especificidad del tratamiento con sacarosa fue evaluada a través de la internalización de marcadores celulares como la transferrina (dependiente de la endocitosis mediada por clatrina) o la toxina de cólera (marcador de la endocitosis mediada por caveolas). La figura 17 muestra que en estas condiciones, la entrada del marcador de la vía, la transferrina, se inhibió mientras que la entrada de marcadores de otras vías como la toxina de cólera, no se afectó.

Para confirmar la participación de esta vía en la entrada de algunas cepas de rotavirus, silenciamos la expresión de la cadena pesada de clatrina mediante interferencia de RNA (RNAi). Este tratamiento bloquea la formación de las jaulas de clatrina y en consecuencia, la entrada de ligandos marcadores de esta vía como transferrina (Figura 18) [19]. Las células fueron transfectadas con un siRNA dirigido contra la cadena pesada de clatrina y posteriormente fueron infectadas con las

distintas cepas, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. El número de células infectadas que fueron transfectadas con el siRNA contra clatrina fueron contadas y comparadas con el número de células infectadas que fueron detectadas con un siRNA irrelevante usado como control. La disminución en la expresión de clatrina se determinó por inmunofluorescencia y ésta fue muy eficiente ya que pocas células (aproximadamente 10%) fueron capaces todavía de expresar esta proteína (Figura 16B). Bajo estas condiciones, la infectividad de RRV no se afectó con este tratamiento, confirmando nuestros resultados previos [93]. En contraste, la infectividad de TFR-41, UK, Wa y reovirus disminuyó (Figura 16C).

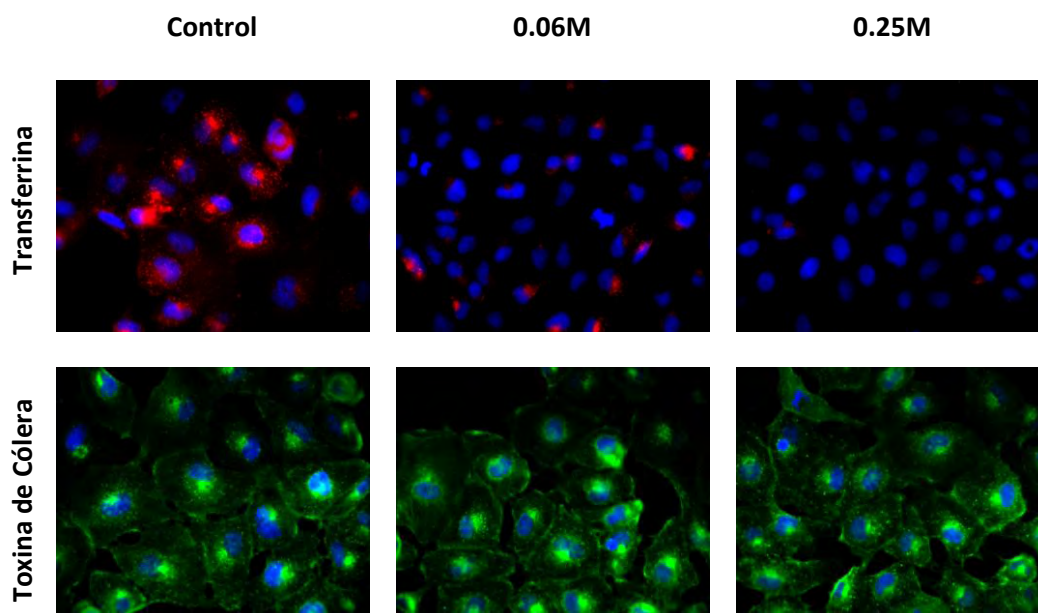


Figura 17. El tratamiento con sacarosa afecta principalmente la internalización de marcadores de endocitosis mediada por clatrina. Las células MA104 fueron pre-tratadas con 0.06M o 0.25M de sacarosa por 10min a 37°C. Posteriormente, se agregó, en presencia de sacarosa, 1µg/ml de toxina de cólera conjugada a Alexa 488 o 50µg/ml de transferrina conjugada a Alexa 546 por 1h a 4°C. Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas y se adicionó medio a 37°C para permitir la entrada de ambos marcadores celulares. A los 15min, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia.

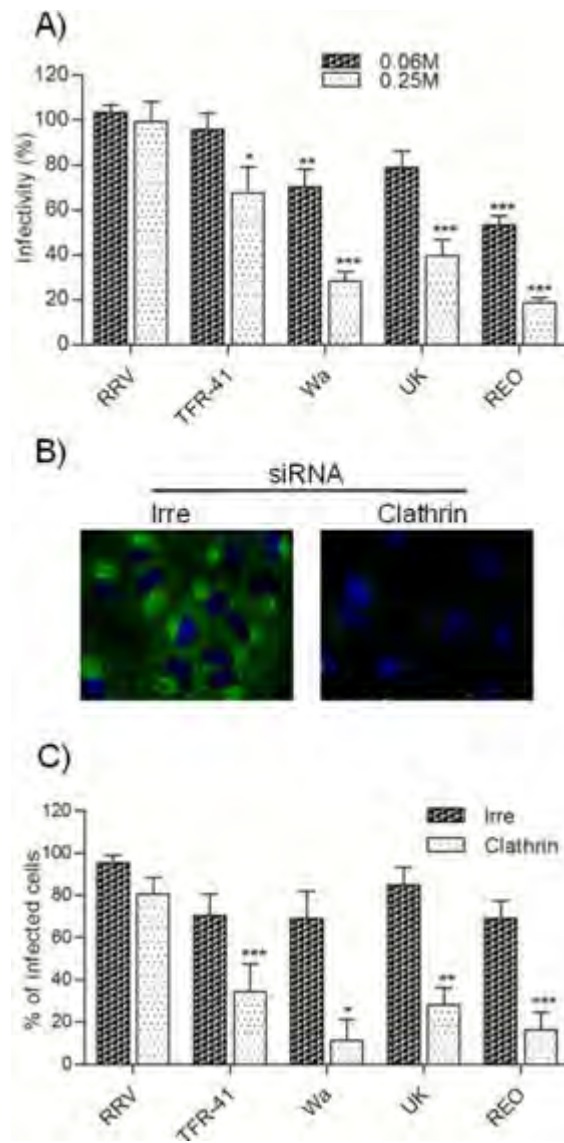


Figura 16. Efecto de los tratamientos que afectan la endocitosis mediada por clatrina en la infectividad viral. (A) Las células MA104 fueron pre-tratadas con las concentraciones indicadas de sacarosa a 37°C por 10min. Posteriormente, las células fueron infectadas y el reactivo se mantuvo durante este periodo. Se dejó proceder la infección por 15h a 37°C. Los resultados están expresados como el porcentaje de infectividad observada en el control (células sin tratar). (B) Inmunofluorescencia mostrando el silenciamiento de la cadena pesada de clatrina. Las células fueron transfectadas, procesadas y teñidas con un anticuerpo contra la cadena pesada de clatrina, seguido de la incubación con un anticuerpo anti-ratón Alexa 488 (verde) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). (C) Las células MA104 crecidas en cubreobjetos fueron transfectadas con los siRNAs indicados y a las 72hpt fueron infectadas. A las seis hpi, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. Las células fueron teñidas como se menciona en (B). La infección con rotavirus fue monitoreada usando un anticuerpo de conejo anti-NSP2 (proteína no estructural de rotavirus) mientras que la infección con Reovirus fue detectada usando un anticuerpo de conejo anti-Reovirus, seguidos de la incubación con un anticuerpo anti-

conejo Alexa 568. Las infectividades fueron expresadas como porcentajes de células infectadas en las células transfectadas con los siRNAs ($n \geq 150$). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

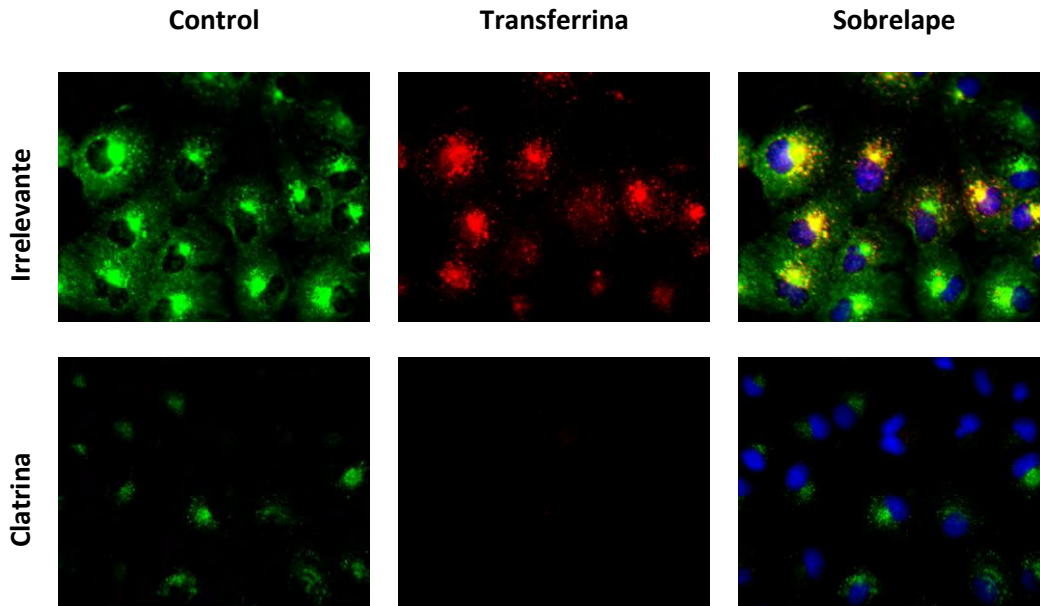


Figura 18. El silenciamiento de clatrina inhibe la entrada de transferrina. Las células MA104 crecidas en cubreobjetos fueron transfectadas con los siRNAs indicados y a las 72h post-transfección fueron lavadas e incubadas con 50 μ g/ml de transferrina conjugada a Alexa 546 por 1h a 4°C. Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas y se adicionó medio a 37°C para permitir la entrada del marcador celular. A los 15min, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia.

Papel de dinamina en la entrada de rotavirus

La dinamina es una GTPasa responsable entre otras cosas, de la escisión de la vesícula endocítica de la membrana plasmática [10]. Una forma mutante dominante negativa, la mutante K44A que contiene un solo cambio de aminoácido en el dominio de GTPasa, ha sido ampliamente usada para inhibir la endocitosis mediada por caveolas o clatrina, y para definir el papel de estas vías en la entrada de varios virus [24, 76, 125, 126]. La participación de dinamina en la entrada de rotavirus fue determinada mediante la transfección de las células con plásmidos que codifican la

forma silvestre o la mutante K44A. El porcentaje de infectividad de las diferentes cepas de rotavirus se estableció cuantificando el número de células transfectadas e infectadas en cada condición. Encontramos que la infectividad de todas las cepas disminuyó alrededor del 70% en las células que expresaban la mutante K44A, sugiriendo que dinamina está involucrada en la entrada de rotavirus (Figura 19A).

Dinamina y clatrina son importantes durante la entrada de rotavirus

Además de sus conocidos papeles en endocitosis, clatrina y dinamina tienen otras funciones en el interior de la célula como son la división celular y la dinámica de los endosomas tardíos [127, 128]. Para confirmar que el papel de estas proteínas fuera en la entrada del virus, transfectamos partículas de doble capa (DLPs) purificadas de RRV, TFR-41 y UK a células a las que previamente se habían lipofectado con siRNAs dirigidos a silenciar la expresión de clatrina o dinamina. Las DLPs no son infecciosas porque carecen de la capa más externa del virus, sin embargo, una vez dentro de la célula pueden replicarse y dar lugar a una infección productiva. Si la ausencia de clatrina o dinamina afectara un paso posterior a la entrada, se esperaría que la infectividad de estas partículas se viera afectada. Los resultados obtenidos mostraron que la reducción en la expresión de clatrina o dinamina no redujo la infectividad de las cepas evaluadas cuando éstas fueron transfectadas (Figura 19B), indicando que el papel de clatrina y dinamina es en la entrada de las cepas de rotavirus. La efectividad de la interferencia de cada proteína fue determinado mediante Western Blot (Figura 19C).

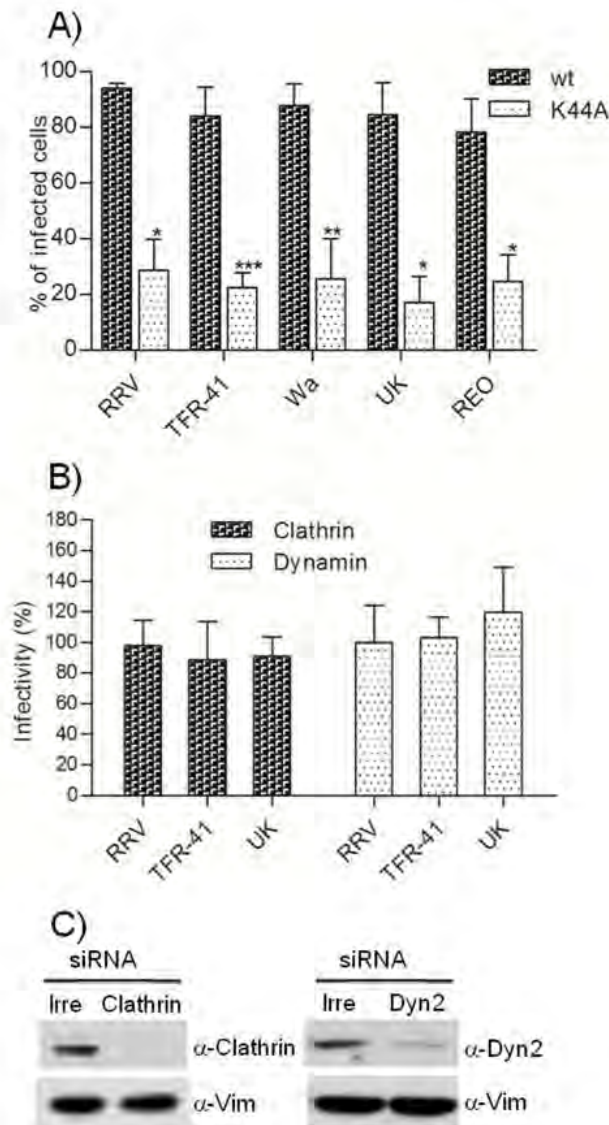


Figura 19. La entrada de rotavirus depende de clatrina y de dinamina-2. (A) Las células MA104 fueron transfectadas con los plásmidos que expresan la forma silvestre (*wt*) o la mutante dominante negativa (K44A) de dinamina-2. Posteriormente, las células fueron infectadas con los virus y procesadas para inmunofluorescencia. La expresión de ambas proteínas de dinamina fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-HA seguido de la incubación con un anticuerpo anti-ratón Alexa 488. Las infecciones con las cepas de rotavirus fueron detectadas como se indica en el pie de la figura 16. Las infectividades son expresadas como porcentajes del número de células infectadas y transfectadas con las construcciones *wt* o K44A ($n \geq 100$). (B) Las células MA104 transfectadas con los siRNAs fueron lipofectadas con DLPs de las cepas indicadas por 1h a 37°C. Después de este periodo, la mezcla de transfección se retiró y las células se mantuvieron con MEM. A las 15hpi las células fueron fijadas y procesadas para el ensayo de inmunoperoxidasa. Los resultados están expresados como el porcentaje de FFUs observadas en el control (células transfectadas con siRNA irrelevante) que representa el 100%. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired *t* test). (C) Inmunoblot de lisados celulares de células MA104 transfectadas con los siRNA indicados. Los anticuerpos usados están indicados, α -

Clathrin (anti-cadena pesada de clatrina), α -Dyn2 (anti-dinamina 2) o α -Vim (anti-vimentina) el cual fue usado como control de carga.

El papel del colesterol, pH y la endocitosis mediada por clatrina es en la entrada de rotavirus

Para confirmar que el papel de la disminución de colesterol, el pH endosomal y la endocitosis mediada por clatrina está en la entrada de las cepas de rotavirus hicimos el tratamiento con los diferentes inhibidores durante la absorción (tiempo en que se dejó entrar al virus) o a las 3hpi, tiempo en el cual rotavirus ya se ha apoderado de la maquinaria celular y comienza a sintetizar sus proteínas virales [129, 130]. Los resultados obtenidos sugieren que la participación del colesterol, pH y la endocitosis mediada por clatrina en las distintas cepas está dada en la entrada ya que su infectividad sólo se afecta cuando los inhibidores se usan durante el periodo de absorción y no a las 3hpi (Figura 20). Los resultados obtenidos con el tratamiento con sacarosa concuerdan con los obtenidos previamente con el interferente de clatrina y la lipofección de DLPs (Figura 19B).

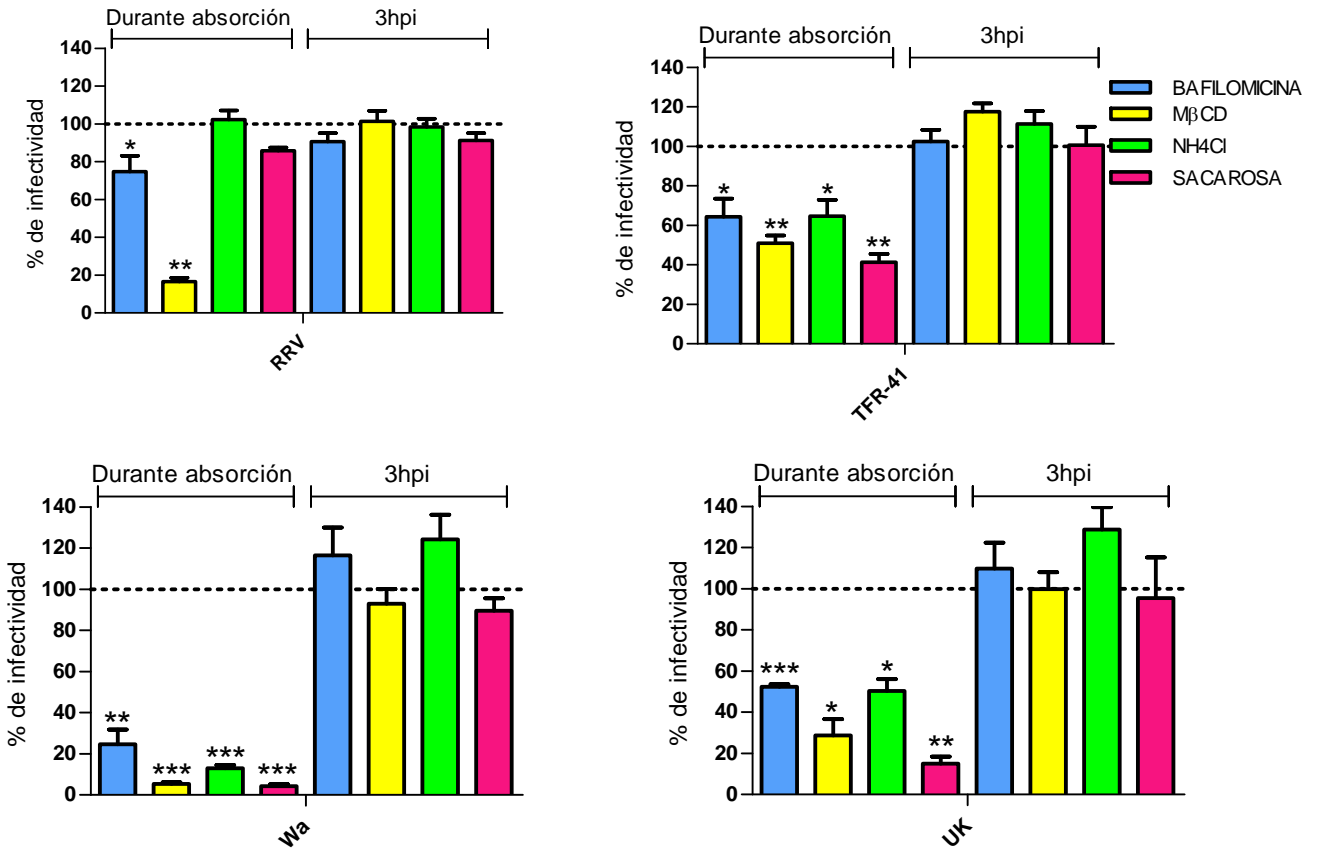


Figura 20. El tratamiento con los diferentes reactivos afecta la entrada de las cepas de rotavirus y no eventos posteriores. El tratamiento durante la absorción se realizó de la siguiente manera: Las células MA104 fueron pre-tratadas con 0.5 μ M de bafilomicina y 10mM de M β CD (por 1h); 100mM de NH₄Cl (por 30min), o 0.5M de sacarosa (por 10min). Después de esta incubación, las células fueron infectadas con las diferentes cepas de rotavirus, en presencia del reactivo (con la excepción de M β CD). Las células fueron lavadas dos veces con 3mM de EGTA en PBS y se dejó proceder la infección por 15h. Para el Tratamiento a las 3hpi, las células fueron infectadas y lavadas con EGTA como se describió previamente y a las 3hpi, las células fueron tratadas con los diferentes reactivos y las células fueron fijadas a las 15hpi. Los datos son expresados como el porcentaje de infectividad con respecto al control (no tratadas) que fue tomado como el 100%. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired *t* test)

B. Papel del citoesqueleto en la entrada de rotavirus

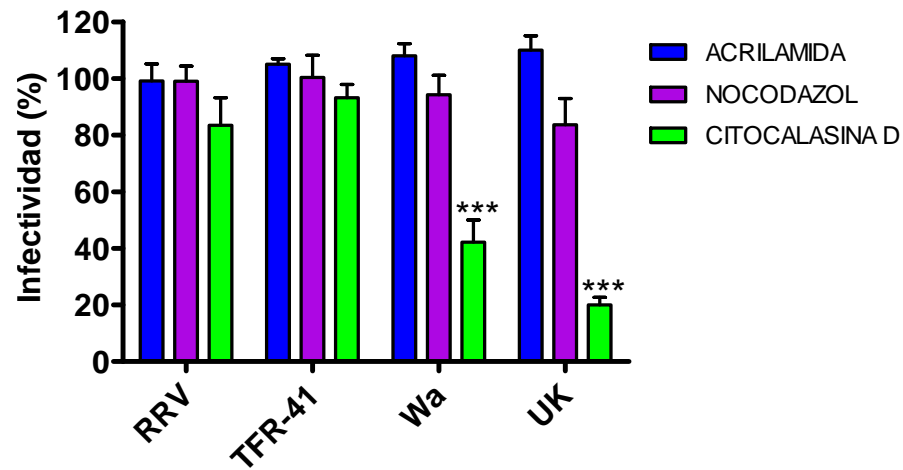
Varios de los procesos endocíticos de la célula son regulados por el citoesqueleto de actina o por los microtúbulos y en consecuencia, la entrada de varios virus depende de la dinámica de estos componentes celulares [13, 24, 131-134].

Para evaluar el papel del citoesqueleto en la entrada de rotavirus utilizamos inhibidores de la polimerización de los tres tipos de citoesqueleto. Para el citoesqueleto de actina utilizamos citocalasina D, para inhibir los microtúbulos se usó nocodazol y para afectar la polimerización de los filamentos intermedios empleamos acrilamida [58, 135].

La figura 21A muestra los resultados obtenidos con estos tratamientos. Encontramos que la infectividad de las cepas Wa y UK disminuyó con los tratamientos con citocalasina D pero la infectividad de las cepas TFR y RRV no se afectó. Los tratamientos con nocodazol y acrilamida no tuvieron efecto sobre la infectividad de las cepas de rotavirus a pesar de que sí afectaron los distintos tipos de citoesqueleto de la célula (Figura 21B). Estos datos sugieren que la entrada de las cepas Wa y UK pudiera depender de la polimerización del citoesqueleto de actina. Sin embargo, el drástico cambio en la morfología de la célula y el hecho de que tratamientos con latrunculina B, otro inhibidor de la polimerización de actina [58], no tenga efecto sobre la infectividad de estas cepas sugiere que este efecto pudiera ser indirecto. Tal vez el tratamiento con citocalasina D altera la localización de proteínas celulares importantes en la entrada de estas dos cepas. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la diferencia en los resultados obtenidos con los dos inhibidores (citocalasina D y latrunculina B) para las cepas Wa y UK sea indicativo de los mecanismos diferentes de acción de cada droga y que la

entrada de estas cepas sí depende del citoesqueleto de actina [58].

A)



B)

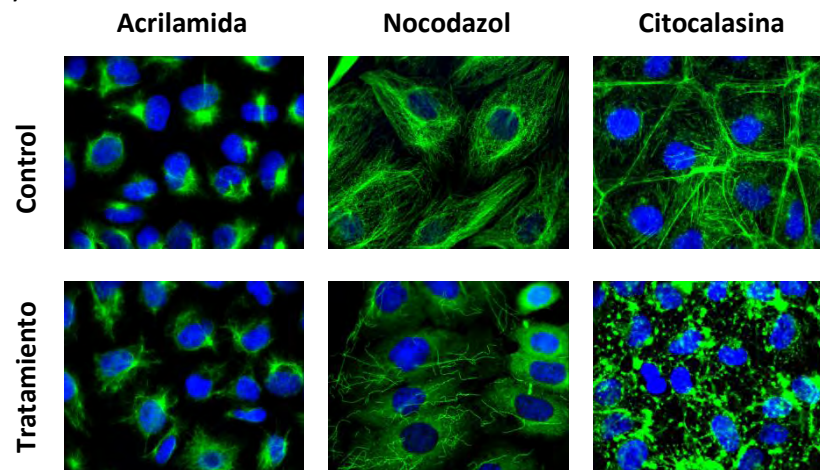


Figura 21. Inhibidores del citoesqueleto tienen diferentes efectos en la infectividad de las cepas de rotavirus. (A) Las células MA104 fueron pre-tratadas con 10mM de acrilamida y 20 μ M de nocodazol por 30min o con 10 μ M de citocalasina D por 1h a 37°C. Posteriormente, las células fueron infectadas y el reactivo se mantuvo durante el periodo de absorción. La infección se dejó proceder por 15h a 37°C y posteriormente, las células se fijaron y se procesaron para inmunotinción. Los resultados están expresados como el porcentaje de infectividad observada en el control (células sin tratar). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired t test). (B) Inmunofluorescencia que muestra el efecto de los inhibidores en las células. Las células fueron tratadas como se menciona en (A) y posteriormente fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. Los distintos tipos de citoesqueleto fueron teñidos con anticuerpos contra vimentina (acrilamida) y tubulina (nocodazol), seguidos de la incubación con un anticuerpo anti-conejo o anti-ratón Alexa 488, respectivamente. Para teñir el citoesqueleto de actina, se utilizó faloidina-acoplada a Alexa 488 (citocalasina D). En todos los tratamientos, los núcleos fueron teñidos con DAPI y se muestran en azul.

Tomados en conjunto, los resultados de esta parte del trabajo sugieren que las cepas de rotavirus entran por vías diferentes, independientemente del tipo de receptor que utilicen (ver Tabla 3, al final de la sección de resultados). La dependencia de la entrada de las cepas al pH ácido también es variable. En el caso del citoesqueleto, es intrigante que algunas cepas no se vieran afectadas por ninguno de los inhibidores, dado que se sabe que tanto los filamentos de actina, como los microtúbulos son importantes para el movimiento de las vesículas endocíticas y los endosomas en la célula [131, 133]. Posiblemente, se requieran tratamientos más largos con los inhibidores dado que el efecto de éstos es reversible y ya se ha reportado que virus como SV40 pueden estar horas detenidos en algún compartimento celular antes de continuar su entrada a la célula [89]. Por otra parte, es interesante notar que la cepa de simio RRV no fue afectada por ninguno de los tratamientos que bloquean los distintos mecanismos de endocitosis sugiriendo que pudiera estar ingresando a la célula por una vía aún no descrita en la literatura. Dadas las diferencias en la vía de endocitosis entre diferentes cepas de rotavirus resulta interesante comparar la vía de entrada entre cepas que utilizan diferentes receptores celulares.

C. Caracterización del tráfico intracelular de las cepas de rotavirus

Para estudiar el tráfico intracelular una vez que el virus ha entrado a la célula, se eligieron dos cepas de rotavirus; UK, que entra por clatrina (como lo demostramos previamente [118]), y RRV, la cual no depende de la endocitosis mediada por clatrina, ni de las caveolas y tampoco de la macropinocitosis [93, 118]. En esta parte del trabajo estudiamos el efecto de silenciar la expresión de

proteínas involucradas en el tráfico intracelular mediante la interferencia de RNA (RNAi) o de la expresión transitoria de mutantes dominantes negativas de algunas de las proteínas sobre la infección viral.

Antes de enfocarnos al estudio del tráfico intracelular evaluamos el papel de flotilina, una proteína actualmente implicada en una nueva vía de endocitosis [37], en la infectividad de las dos cepas. Para comparar, inhibimos la endocitosis mediada por clatrina a través de la expresión de una mutante dominante negativa de Eps15, una proteína importante para que clatrina sea reclutada a la membrana. Esta mutante carece de los dominios necesarios para la localización de Eps15 a las jaulas de clatrina [53]. El porcentaje de infectividad se determinó estableciendo si las células que expresaban Eps15 silvestre o mutante estaban o no infectadas con las distintas cepas de rotavirus. La figura 22A muestra que como era de esperarse, la infectividad de la cepa UK se afectó por la expresión de la mutante de Eps15 mientras que la de RRV no, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con el interferente de clatrina [118]. En el caso de flotilina, usamos un interferente para inhibir la expresión de esta proteína (Figura 22B). En estas condiciones, la infectividad de la cepa UK no se afectó mientras que la de la cepa RRV sí disminuyó (Figura 22A) sugiriendo que esta cepa de simio pudiera entrar a la célula por una endocitosis mediada por flotilina-1.

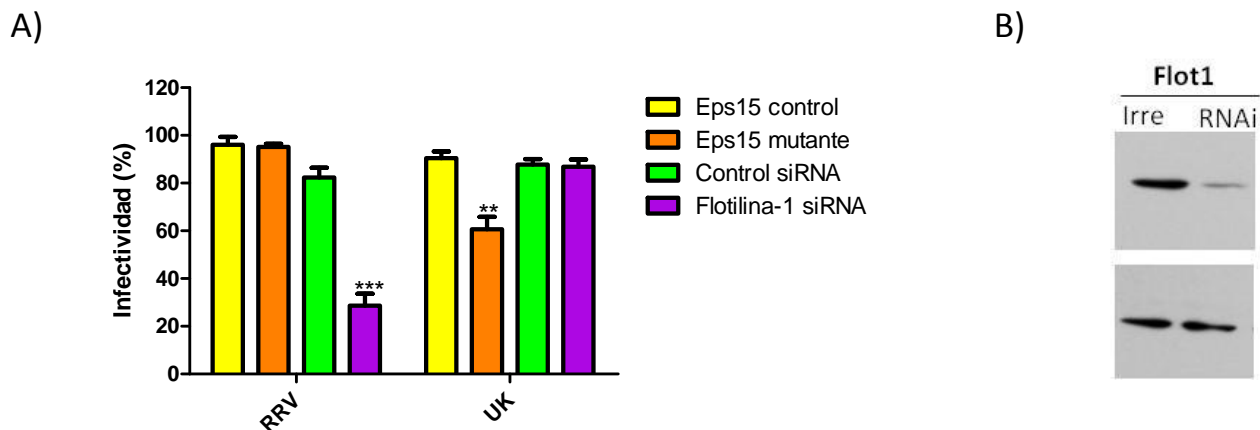


Figura 22. Las cepas de rotavirus utilizan vías de endocitosis diferentes. (A) Se muestran los resultados cuando se transfectoron plásmidos que expresan la mutante dominante negativa de eps15 (Eps15 mutante) o la proteína control (Eps15 control) a las células MA104. Posteriormente las células fueron infectadas con los virus y procesadas para inmunofluorescencia. La expresión de ambas formas se monitoreo a través de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés). Además se muestran los resultados obtenidos cuando se disminuyó la expresión de flotilina-1 mediante la transfección de siRNAs como se describió previamente [118]. Las infecciones con las cepas de rotavirus fueron detectadas como se indica en el pie de la figura 16. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (unpaired t test). (B) Inmunoblot que muestra el silenciamiento de flotilina-1.

Continuando la caracterización de la entrada de las dos cepas de rotavirus, exploramos de manera general el tráfico vesicular de las partículas virales internalizadas. En particular estudiamos el papel de la vía endosomal en la entrada de rotavirus. Para esto inhibimos la expresión de varias proteínas claves para la entrega o la fusión de la vesícula endocítica a estos organelos como son las Rab GTPasas [136-138]. En primer lugar, silenciamos la expresión de la proteína Rab5 (la cual tiene tres isoformas Rab5a, Rab5b y Rab5c), encargada de, entre otras cosas, entregar la vesícula endocítica a los endosomas tempranos [64]. Los resultados sugieren que tanto RRV como la cepa UK transitan por los endosomas tempranos dado que su infectividad se afecta cuando se reduce la expresión de las proteínas Rab5a, Rab5b y Rab5c (Figura 23). Este resultado fue confirmado al inhibir EEA1, proteína

efectora de Rab5 y una de las proteínas involucradas en la fusión de la vesícula endocítica a los endosomas tempranos [62, 63, 139] (Figura 23).

Para evaluar si los endosomas tardíos o los lisosomas participan en la vía del tráfico viral, inhibimos la expresión de las GTPasas Rab7 y Rab9. Rab7 es importante para la fusión de la vesícula que proviene de los endosomas tempranos a los endosomas tardíos y también en la biogénesis de los lisosomas [46, 137] mientras que Rab9 participa en la entrega de enzimas hidrolíticas recién sintetizadas en el Golgi a los endosomas, además de regular el tamaño de los endosomas tardíos [140, 141]. Los resultados obtenidos muestran que ambas cepas se afectaron cuando se reducen los niveles de Rab7 mientras que sólo RRV se afecta en ausencia de Rab9 (Figura 23). Estos resultados apuntan a que ambas cepas pudieran transitar por los endosomas tardíos o los lisosomas. El efecto de Rab9 sobre RRV no es tan fácil de explicar dada la función que se le ha atribuido a esta proteína. Sin embargo, se ha observado que estas Rab GTPasas pueden jugar otros papeles, además del ya descrito [47, 140, 142] por lo que aún no podemos establecer claramente cuál sería la función de Rab9 en el tráfico vesicular de RRV.

Además de las Rab GTPasas, recientemente otras GTPasas han sido involucradas en la regulación de la internalización de cargos celulares, entre ellas están Arf6, Cdc42 y RhoA (Figura 1) [31, 33, 36]. Como se mencionó previamente, mutantes dominantes negativos de Arf6 bloquean la entrada de ligandos celulares [36]. En cuanto a Cdc42 y RhoA, ambas miembros de las Rho GTPasas proteínas tradicionalmente conocidas como reguladoras del citoesqueleto de actina [143], ahora se sabe que algunos miembros de la familia se localizan en los endosomas y que interactúan con

proteínas de la maquinaria endocítica [144, 145]. La internalización de diferentes moléculas como receptores celulares o virus es regulada por estas proteínas [31, 146, 147].

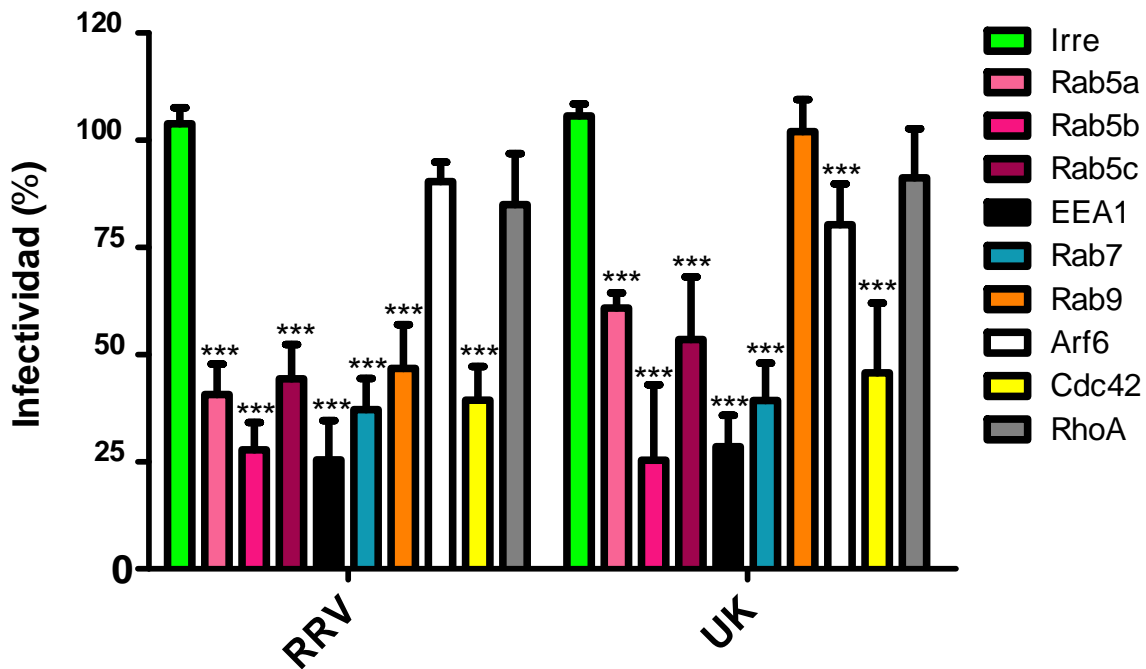


Figura 23. A pesar de utilizar mecanismos de endocitosis diferentes, las cepas de rotavirus comparten varias proteínas en su vía de entrada. Efecto en la infectividad de las dos cepas probadas en este estudio cuando se silenciaron varias proteínas involucradas principalmente en tráfico intracelular. Las células MA104 crecidas en cubreobjetos fueron transfectadas con los siRNAs indicados y a las 72h post-transfección fueron infectadas. A las 6hpi, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. Las infecciones con las cepas de rotavirus fueron detectadas como se indica en el pie de la figura 16. Las infectividades fueron expresadas como porcentajes de células infectadas en las células transfectadas con los siRNAs (n≥150). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (unpaired *t* test).

En este trabajo analizamos si estas proteínas podrían participar en la infección por rotavirus y las inhibimos utilizando la estrategia ya descrita. La figura 23 muestra que el silenciamiento de Cdc42 afectó claramente ambas cepas mientras que el efecto por la ausencia de Arf6 es menor y sólo afectó

a la cepa UK. Mediante la expresión de plásmidos que expresan la forma silvestre, una mutante dominante negativa que preferencialmente une GDP en vez de GTP (Cdc42 DN), o una mutante constitutivamente activa que tiene una actividad pobre como GTPasa (Cdc42 CA), determinamos que las cepas UK y RRV requieren que la GTPasa Cdc42 este activa (Figura 25).

La eficiencia del silenciamiento de las proteínas estudiadas en el tráfico intracelular fue evaluada por western blot o PCR en tiempo real y varía entre 50% hasta 90% de disminución (Figura 24). Se puede ver que los interferentes utilizados contra las isoformas de Rab5 son específicos dado que no afectaron la expresión de otras isoformas (Figura 24A). En el caso de Rab5c, dado que no contábamos con anticuerpos específicos contra esta proteína, se cuantificó la disminución del mRNA mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 24B).

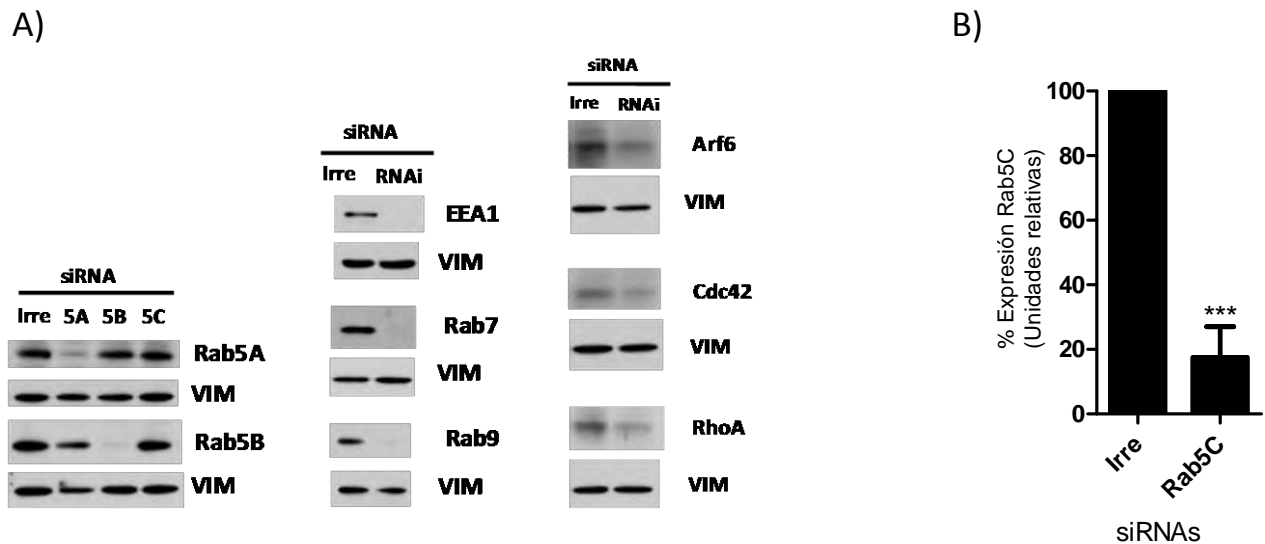


Figura 24. Verificación del silenciamiento de las diferentes proteínas inhibidas en este trabajo. (A) Inmunoblots de las diferentes proteínas que se inhibieron donde se aprecia el silenciamiento obtenido en cada caso. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra vimentina (vim). (B) Cuantificación del gen de Rab5C por RT-PCR en tiempo real para determinar la eficiencia del silenciamiento. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (unpaired t test).

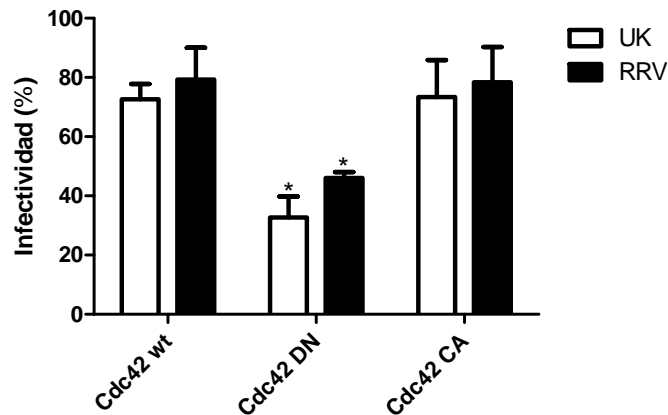


Figura 25. Rotavirus requiere que la GTPasa Cdc42 este activa durante la infección. Las células MA104 fueron transfectadas con plásmidos que expresan la forma silvestre (Cdc42 wt), una mutante dominante negativa (Cdc42 DN) o una mutante constitutivamente activa (Cdc42 CA) y posteriormente infectadas con las cepas de rotavirus. A las 6hpi, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. La expresión de las proteínas se monitoreo a través de la expresión de GFP. Las infecciones con las cepas de rotavirus fueron detectadas como se indica en el pie de la figura 16. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (unpaired *t* test)

Por otro lado, evaluamos si el silenciamiento de estas proteínas afectaba la viabilidad de la célula a través de la liberación de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos muestran que los interferentes utilizados en este trabajo no son tóxicos para la célula (Figura 26).

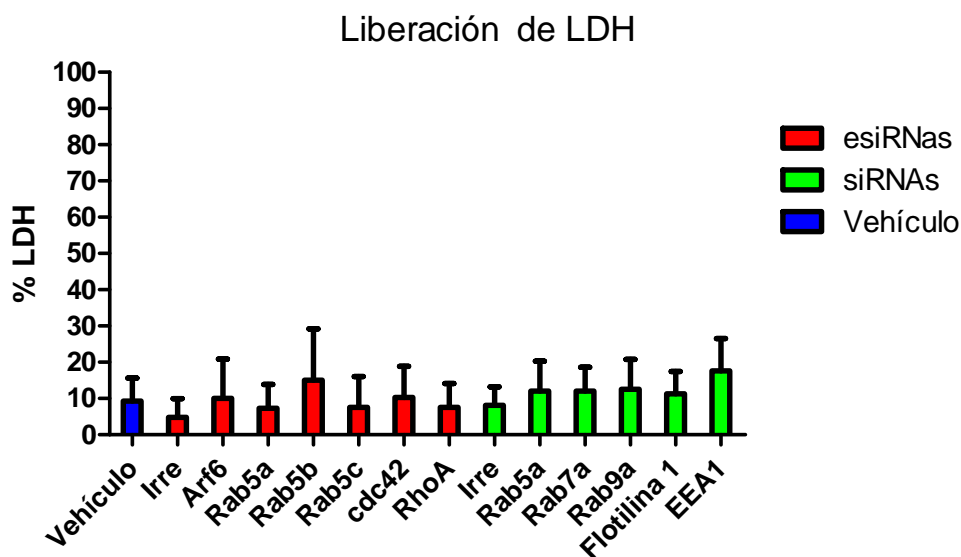


Figura 26. Los interferentes usados en este trabajo no inducen muerte celular. Las células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos fueron transfectadas con los interferentes indicados y a las 72h post-transfección fueron lavadas e incubadas a 37°C por 7h. Al finalizar la incubación, el medio celular fue colectado y la actividad de deshidrogenasa láctica (LDH) fue determinada. Los resultados están expresados como el porcentaje de actividad observada en el control (células transfectadas con el interferente irrelevante).

D. Las proteínas que participan en tráfico intravesicular, evaluadas en este trabajo, afectan la entrada de rotavirus y no un evento posterior

Para determinar si el papel de las proteínas descritas anteriormente es en la etapa de entrada de las cepas de rotavirus y no en pasos posteriores, las células fueron transfectadas con cada uno de los siRNAs y lipofectadas con DLPs (como se describió previamente [118]) y se midió su efecto en la infectividad viral. Si el efecto de las proteínas silenciadas es en la entrada, se esperaría que el número de células infectadas fuera cercano al control, es decir, que la infectividad no se afectara. Por otro lado, si la proteína silenciada tiene otro(s) papel(es) durante el ciclo viral, el número de células infectadas disminuiría o aumentaría. En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos al lipofectar

las DLPs de las cepas RRV y UK en las células transfectadas con los diferentes interferentes. Encontramos que la infectividad de las partículas virales no fue afectada en ningún tratamiento, sugiriendo que estas proteínas participan en la entrada de estas cepas de rotavirus (Figura 27).

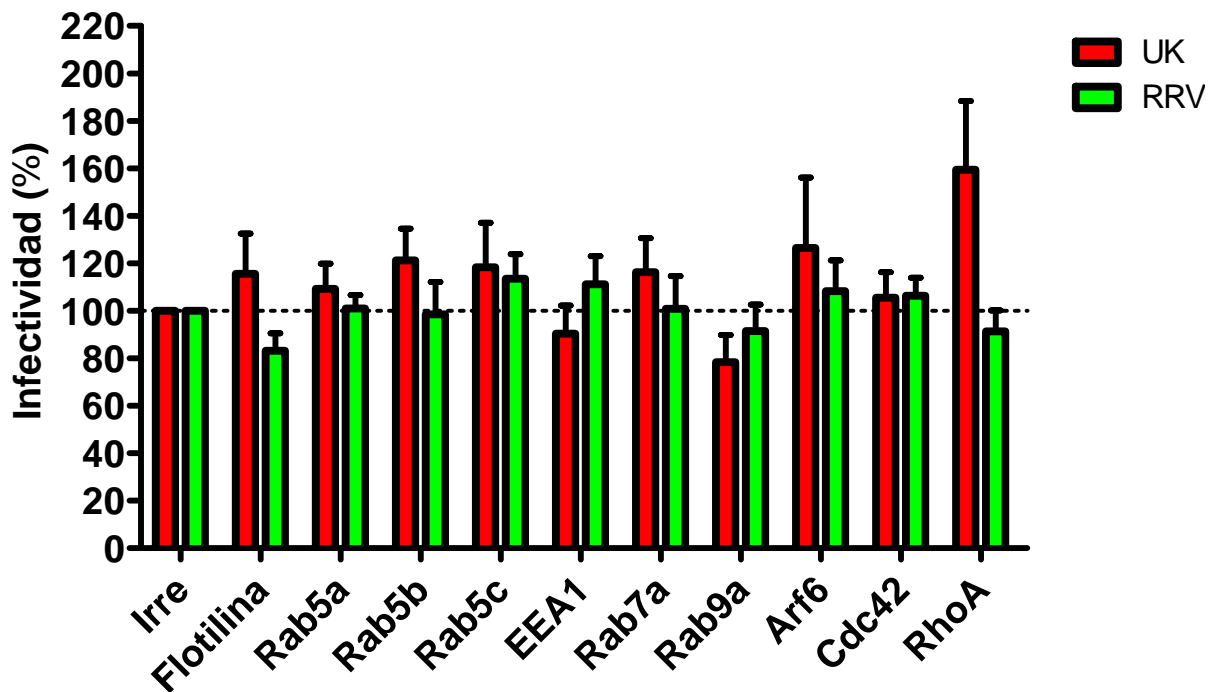


Figura 27. El efecto en la infectividad de RRV y UK cuando se silencia la expresión de diferentes genes celulares involucrados en la regulación de la endocitosis es en la etapa de entrada. Las células MA104 transfectadas con los diferentes interferentes fueron lipofectadas con DLPs de las dos cepas por 1h a 37°C. A las 15hpi las células fueron fijadas y la infección se detectó por inmunotinción. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$ (paired t test)

Tabla 3. Resumen del efecto de las drogas y dominantes negativas usadas en este trabajo

Tratamiento		RRV	TFR-41	Wa	UK
Inhibidor	M β CD	+++	+++	+++	+++
	NH ₄ Cl	—	++++	++++	++++
	Bafilomicina	+	++	+++	++
	DMA	—	—	—	—
	Sacarosa	—	++	+++	+++
mAb	Hsc70	++	++	++	++
Citoesqueleto	Acilamida	—	—	—	—
	Citocalasina D	—	—	+++	+++
	Nocodazol	—	—	—	—
Dominante Negativa	Caveolina-1	—	—	—	—
	Dinamina-2	+++	+++	+++	+++
	Eps15	—	—*	—*	++
	Cdc42	+++	ND	ND	+++
siRNAs	Arf6	—	ND	ND	++
	Cdc42	+++	ND	ND	+++
	Cadena pesada de clatrina	—	+++	+++	+++
	EEA1	+++	ND	ND	+++
	Flotilina-1	+++	ND	ND	—
	Rab5a	+++	ND	ND	+++
	Rab5b	+++	ND	ND	+++
	Rab5c	+++	ND	ND	+++
	Rab7a	+++	ND	ND	+++
	Rab9a	+++	ND	ND	—
	RhoA	—	ND	ND	—

- No se afecta la infectividad
- + Disminución en la infectividad igual o menor al 30%
- ++ Disminución en la infectividad entre 30 y 50%
- +++ Disminución en la infectividad mayor al 50%
- ND No se determinó
- * Determinado en otro trabajo

VIII. Discusión

La entrada de rotavirus a su célula huésped es un proceso que involucra varios pasos y en el que diversas proteínas, tanto celulares como virales, están involucradas. En este trabajo evaluamos el papel de varias proteínas celulares involucradas en distintas vías de endocitosis, en la entrada de rotavirus. Inicialmente, caracterizamos la entrada de cuatro cepas que difieren en sus requerimientos por los receptores celulares [118]. Los resultados muestran que independientemente del receptor que utilicen, las cepas de rotavirus pueden entrar por vías diferentes siendo la endocitosis mediada por clatrina una de estas rutas (Tabla 3). Además, en este estudio determinamos que la entrada de tres de las cuatro cepas de rotavirus evaluadas depende del pH endosomal (Tabla 3). Explorando el papel del citoesqueleto en la entrada de rotavirus, también observamos diferencias entre las cepas (Tabla 3). Sin embargo, las cepas evaluadas en este estudio comparten su dependencia por el colesterol presente en la membrana plasmática y por la proteína de choque térmico Hsc70, uno de los receptores conocidos para rotavirus [105, 119].

El hecho de que virus que pertenecen al mismo género usen diferentes vías de endocitosis para infectar a la célula ya ha sido descrito previamente [148-152]. Inclusive, ya se ha reportado que cepas de virus de la misma familia pueden utilizar la misma ruta de endocitosis y sin embargo, tener diferencias en las proteínas reclutadas o activadas durante el proceso de entrada viral (como es el caso de dos cepas de vaccinia) [152]. Por lo tanto, la observación de que cepas de rotavirus aisladas de diferentes especies animales utilicen distintas vías de endocitosis no fue inesperada. En nuestro

caso, encontramos que tres de las cuatro cepas evaluadas (la cepa bovina UK, la cepa humana Wa y la cepa porcina TFR-41) utilizan la vía de endocitosis mediada por clatrina para entrar a la célula [118] y resultados recientes indican que la cuarta cepa (la cepa de simio RRV) podría estar utilizando una nueva vía de endocitosis mediada por flotilina (resultados sin publicar). Además, encontramos que a pesar de que las cepas utilicen la misma vía de entrada (en este caso, la endocitosis mediada por clatrina) existen diferencias en la sensibilidad con que la infectividad de cada cepa se afecta con el uso de los diferentes inhibidores lo que sugiere que probablemente, la afinidad o el orden de interacción con los receptores celulares de cada cepa es distinta, provocando diferencias en la vía de señalización o reclutamiento de proteínas necesarias para cada ruta de entrada. Es por esto, que se continuó la caracterización de la entrada de rotavirus, pero ahora el trabajo se enfocó al tráfico intracelular de los virus internalizados. Para esta parte del trabajo se utilizaron dos de las cuatro cepas, UK y RRV, las cuales entran a la célula por vías endocíticas diferentes [118].

Integrando los datos obtenidos de los silenciamientos de las proteínas involucradas en el tráfico intravesicular, con los resultados de la caracterización de la entrada de las cuatro cepas, podemos delinear los siguientes eventos: la cepa bovina UK entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina y dinamina, su entrada es sensible al pH endosomal y además, depende de las proteínas Cdc42, Rab5, EEA1 y Rab7 (Figura 28 y Tabla 3). Para la cepa de simio RRV los datos sugieren que esta cepa entra a la célula por una vía dependiente de flotilina y dinamina pero independiente del pH endosomal. Al parecer RRV entra a la célula por una vía aún no caracterizada que depende de flotilina [37], aunque faltarían más experimentos que nos permitan confirmar este resultado. Las proteínas

Cdc42, Rab5, EEA1 y Rab7 también están involucradas en la entrada de esta cepa; sin embargo, la GTPasa Rab9a marca una diferencia a nivel intracelular entre las dos cepas (Figura 28 y Tabla 3).

La dependencia de las cepas UK y RRV por Rab5, sugiere que estos virus transitan por los endosomas tempranos una vez dentro de la célula (Figura 28). La dependencia por EEA1, un conocido efector de Rab5, apoya esta idea [62, 63, 65]. En este trabajo evaluamos el papel de las tres isoformas de Rab5 en la entrada de rotavirus y encontramos que las tres isoformas participan en este proceso (Figura 23). Hasta el momento, se conoce que la internalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) utiliza las tres isoformas de Rab5 [153]. Sin embargo, en este sistema encontraron que se requiere el silenciamiento simultáneo de las tres isoformas para tener una clara reducción en la entrada de este receptor. Sería interesante probar si el efecto de Rab5 sobre la infección por rotavirus se potencia en presencia de bajos niveles de las tres isoformas. La co-localización a tiempos tempranos de partículas de UK o RRV con Rab5 (ambos marcados fluorescentemente) sería también, una fuerte evidencia del papel de esta GTPasa en el tráfico intracelular de rotavirus. Además, la presencia de virus en vesículas o endosomas purificados junto con la detección de Rab5 o EEA1 en estos compartimentos, apoyaría el papel de estas proteínas en la entrada de rotavirus.

La dependencia por Rab7 sugiere que las cepas UK y RRV transitan por los endosomas tardíos o los lisosomas (Figura 28). Sin embargo, sólo RRV requiere de Rab9. Estas dos Rab GTPasas a pesar de estar en el mismo organelo parecen estar en dominios diferentes. Además, tienen funciones diferentes. Rab7 está involucrada en la fusión de las vesículas a los endosomas tardíos, mientras que Rab9 participa en el transporte de receptores de manosa-6-fosfato (MPRs) vacíos de los endosomas al Aparato de Golgi, donde captura enzimas hidrolíticas recién sintetizadas en este organelo y las

distribuye a la vía endosomal [154]. Al igual que con Rab5 y EEA1, la co-localización a tiempos tempranos de partículas de rotavirus con Rab7 sería evidencia de la participación de esta GTPasa en el tráfico intracelular de este virus. Es de esperarse, que rotavirus interactúe primero con las proteínas de los endosomas tempranos (Rab5 y EEA1) y posteriormente, lo haga con Rab7. Sin embargo, se sabe que el proceso de formación o maduración de la vía endosomal en endosomas tempranos, tardíos y lisosomas puede variar dependiendo el tipo celular [81] por lo que cabe la posibilidad de que en esta línea celular, existan endosomas que tengan tanto Rab5 como Rab7 y que, por lo tanto, rotavirus pueda utilizar estas proteínas al mismo tiempo.

El papel de Cdc42 en la vía de entrada de las cepas UK y RRV pudiera ser porque esta proteína regula el citoesqueleto de actina, o bien por alguna otra función aun no caracterizada, es posible que Cdc42 pudiera mediar otro mecanismo de endocitosis [155]. Cabe mencionar que ya existe al menos un reporte de moléculas cuya internalización es regulada por esta proteína [33]. En el caso de RRV, su infectividad no se vio afectada al tratar las células con diferentes drogas que alteran el citoesqueleto de actina, sugiriendo que el papel de cdc42 en la entrada de RRV no tiene que ver con su papel canónico de regulador del citoesqueleto de actina (Figura 21A). Para la cepa bovina UK, el efecto de Cdc42 pudiera ser la regulación del citoesqueleto de actina dado que esta cepa sí se afecta con los tratamientos con citocalasina D (Figura 21A). Con los resultados de la mutante dominante negativa de Cdc42, sabemos que es necesario que esta GTPasa esté activa durante la infección por rotavirus. Se requieren más estudios para establecer detalladamente el papel de Cdc42 en la entrada de rotavirus. La presencia de esta proteína en vesículas o endosomas purificados, su reclutamiento a

estos organelos o bien su presencia en la membrana plasmática en la infección por rotavirus, daría más información sobre su participación en la entrada de este virus.

Resultados de Daniela Silva *et al*, en nuestro laboratorio, apoyan el papel de la vía endosomal durante la infección por rotavirus (manuscrito en preparación) ya que encontró que la cepa de simio RRV requiere de varias subunidades del complejo ESCRT, un complejo presente a lo largo de esta vía (Figura 1 y 4) y que es necesario, entre otras cosas, para la distribución del cargo a los lisosomas [73, 156]. Además, en este trabajo se encontró que la infectividad de RRV disminuye en ausencia del receptor de manosa-6-fosfato dependiente de catión, lo que apoya la idea de que el papel de Rab9 pudiera ser porque esta cepa requiera la presencia de alguna enzima en la vía endosomal.

En resumen, los resultados obtenidos indican que, la cepa bovina UK entra a la célula por la vía endocítica clásica: dependiente de clatrina, eps15, dinamina, es sensible al pH endosomal y transita por la vía endosomal (EEA1, Rab5 y Rab7) mientras que la cepa de simio RRV parece utilizar una vía nueva que requiere flotilina-1 y dinamina pero que al igual que UK, también pasa por la vía endosomal (Figura 28 y Tabla 3). Queda aún por determinar en qué paso de la vía, los virus escapan hacia el citoplasma donde se replican. Estudios en células vivas utilizando tanto virus como proteínas celulares fluorescentes de los distintos procesos endocíticos, serán de mucha utilidad para confirmar, aclarar y dar más información sobre la vía de entrada de los rotavirus.

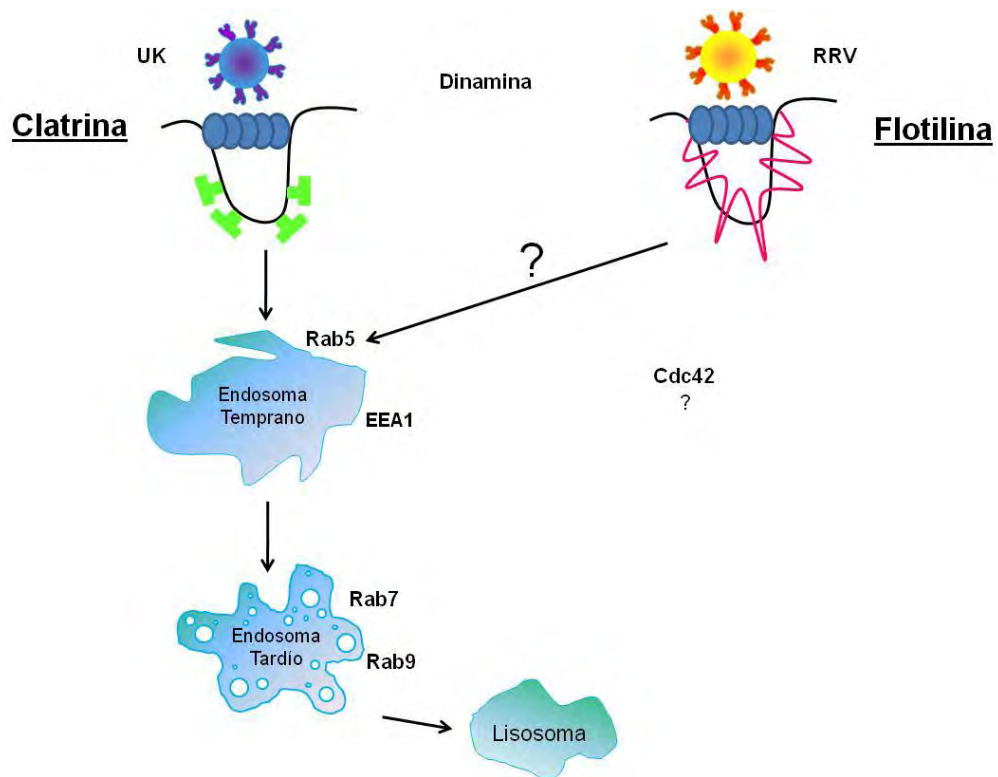


Figura 28. Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo. Muestra las diferentes proteínas y organelos celulares que podrían estar participando en la vía de entrada de las cepas de rotavirus utilizadas en este trabajo.

IX. Conclusiones

- Las cepas de rotavirus utilizadas en este trabajo comparten el requerimiento por colesterol y la proteína Hsc70.
- Las cepas de rotavirus entran a la célula por vías de endocitosis diferentes y esto no correlaciona con el uso de receptores.
- Las cepas UK, Wa y TFR utilizan la ruta mediada por clatrina para ingresar a la célula y de acuerdo con su internalización por esta vía, su entrada depende del pH endosomal
- La cepa RRV parece entrar a su célula huésped por una vía dependiente de flotilina-1 y dinamina, pero independiente de pH.
- A pesar de utilizar diferentes mecanismos de endocitosis para entrar, las cepas UK y RRV comparten varias de las proteínas involucradas en tráfico intracelular como son Rab5, EEA1 y Rab7. La diferencia la marca la GTPasa Rab9, que sólo es requerida por RRV.
- Con respecto a Cdc42, tanto UK como RRV dependen de esta enzima. Sin embargo, debido a su amplio espectro de funciones, se requieren más experimentos para determinar si esta GTPasa pudiera estar mediando otra vía de endocitosis o bien participar en algún proceso intracelular.

X. Perspectivas

1. Identificar que proteína (s) viral (es) es la responsable de la diferencia en la vía de entrada de las cepas RRV y UK utilizando la estrategia de virus rearreglantes.
2. Caracterizar la vía de entrada de rotavirus en células vivas utilizando tanto virus como proteínas celulares marcadas fluorescentemente.
3. Confirmar el papel de flotilina.
4. Purificar vesículas/endosomas en células infectadas e identificar otras proteínas celulares involucradas en la vía de entrada.
5. Identificar si existen cambios estructurales en las partículas virales cuando se encuentran en estos compartimentos, ¿siguen las proteínas virales VP4 y VP7 asociadas a la partícula viral?, ¿ya se liberaron o permanecen asociadas pero con cambios conformacionales?
6. Determinar el paso de la vía endocítica en la que el virus penetra hacia el citoplasma de la célula.

XI. Referencias

1. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009;78:857-902.
2. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:603-12.
3. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell* 2006;124:729-40.
4. Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:423-34.
5. Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11821-7.
6. Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1957-76.
7. Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:639-49.
8. Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:713-26.
9. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2010;79:803-33.
10. Danino D, Hinshaw JE. Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:454-60.
11. Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 1998;141:85-99.
12. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:483-519.
13. Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* 2002;4:691-8.
14. Orth JD, McNiven MA. Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:31-9.
15. Sever S, Damke H, Schmid SL. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 2000;1:385-92.
16. Takei K, Haucke V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol* 2001;11:385-91.

17. Schelhaas M. Come in and take your coat off - how host cells provide endocytosis for virus entry. *Cell Microbiol* 2010.
18. Royle SJ. The cellular functions of clathrin. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1823-32.
19. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 2003;162:909-18.
20. Veiga E, Cossart P. Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2005;7:894-900.
21. Traub LM. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:583-96.
22. Krajewska WM, Maslowska I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:195-220.
23. Pelkmans L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:295-304.
24. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002;296:535-9.
25. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 2009;11:510-20.
26. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic* 2009;10:364-71.
27. Tkachenko E, Lutgens E, Stan RV, Simons M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J Cell Sci* 2004;117:3189-99.
28. Liberali P, Kakkonen E, Turacchio G, et al. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J* 2008;27:970-81.
29. Koivusalo M, Welch C, Hayashi H, et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol* 2010;188:547-63.
30. Mercer J, Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 2008;320:531-5.
31. Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Utry-Varsat A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 2001;7:661-71.
32. Sauvonnnet N, Dujeancourt A, Utry-Varsat A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gamma cytokine receptor. *J Cell Biol* 2005;168:155-63.

33. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2002;2:411-23.
34. Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Feliciangeli SF, Hung CH, Thomas G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 2002;111:853-66.
35. Kang YS, Zhao X, Lovaas J, Eisenberg E, Greene LE. Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. *J Cell Sci* 2009;122:4062-9.
36. Powelka AM, Sun J, Li J, et al. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* 2004;5:20-36.
37. Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:46-54.
38. Payne CK, Jones SA, Chen C, Zhuang X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* 2007;8:389-401.
39. Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 2005;168:477-88.
40. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:94-103.
41. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:121-32.
42. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:597-608.
43. Falguieres T, Luyet PP, Gruenberg J. Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp Cell Res* 2009;315:1567-73.
44. Mullins C, Bonifacino JS. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 2001;23:333-43.
45. Markgraf DF, Peplowska K, Ungermann C. Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Lett* 2007;581:2125-30.
46. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van DB. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 2000;11:467-80.
47. Carroll KS, Hanna J, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* 2001;292:1373-6.
48. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006;80:6964-72.

49. Maruoka N, Murata T, Omata N, et al. Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: A dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:178-86.
 50. Hansen SH, Sandvig K, van DB. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* 1993;121:61-72.
 51. Heuser JE, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 1989;108:389-400.
 52. Judah JD, Howell KE, Taylor JA, Quinn PS. Potassium depletion inhibits the intracellular transport of secretory proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J Cell Sci* 1989;92 (Pt 2):173-85.
 53. Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, utry-Varsat A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 9):1303-11.
 54. Perry JW, Wobus CE. Endocytosis of Murine Norovirus 1 (MNV-1) into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J Virol* 2010.
 55. Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6775-80.
 56. Trouet D, Hermans D, Droogmans G, Nilius B, Eggermont J. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:461-5.
 57. Peterson JR, Mitchison TJ. Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem Biol* 2002;9:1275-85.
 58. Spector I, Braet F, Shochet NR, Bubbs MR. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 1999;47:18-37.
 59. Misinzo G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol* 2005;86:2057-68.
 60. Garcia ML, King VF, Shevell JL, et al. Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J Biol Chem* 1990;265:3763-71.
 61. Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J, Just I. Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:592-7.
 62. Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 1998;394:494-8.
 63. Mills IG, Urbe S, Clague MJ. Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *J Cell Sci* 2001;114:1959-65.
 64. Mills IG, Jones AT, Clague MJ. Regulation of endosome fusion. *Mol Membr Biol* 1999;16:73-9.
-

65. Mills IG, Jones AT, Clague MJ. Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr Biol* 1998;8:881-4.
66. Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:631-43.
67. Seabra MC, Wasmeier C. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:451-7.
68. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:159-80.
69. Hicke L, Dunn R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:141-72.
70. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 2007;315:201-5.
71. Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:4-11.
72. Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519-47.
73. Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:556-66.
74. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010;464:864-9.
75. Tsai B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:23-43.
76. Ghigo E, Kartenbeck J, Lien P, et al. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000087.
77. Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 2004;78:10543-55.
78. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307:1-11.
79. Sun X, Yau VK, Briggs BJ, Whittaker GR. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 2005;338:53-60.
80. Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:567-73.
81. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000244.

82. Ehrlich M, Boll W, Van OA, et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 2004;118:591-605.
83. Puri A, Booy FP, Doms RW, White JM, Blumenthal R. Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. *J Virol* 1990;64:3824-32.
84. Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 2005;308:1643-5.
85. Ebert DH, Deussing J, Peters C, Dermody TS. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* 2002;277:24609-17.
86. Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996;7:1825-34.
87. Beer C, Andersen DS, Rojek A, Pedersen L. Caveola-dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J Virol* 2005;79:10776-87.
88. Marjomaki V, Pietiainen V, Matilainen H, et al. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J Virol* 2002;76:1856-65.
89. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 2001;3:473-83.
90. Schelhaas M, Malmstrom J, Pelkmans L, et al. Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 2007;131:516-29.
91. Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 2001;75:11166-77.
92. Gilbert JM, Benjamin TL. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* 2000;74:8582-8.
93. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* 2004;78:2310-8.
94. Sieczkarski SB, Whittaker GR. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2002;76:10455-64.
95. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-72.
96. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004;101:67-81.

97. Graham KL, Halasz P, Tan Y, et al. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol* 2003;77:9969-78.
98. Lopez T, Camacho M, Zayas M, et al. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* 2005;79:184-92.
99. Isa P, Gutierrez M, Arias CF, Lopez S. Rotavirus cell entry. *Future Virology* 2008;3:135-46.
100. Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 1991;181:553-63.
101. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5389-94.
102. Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* 2000;74:228-36.
103. Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, et al. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol* 2002;76:1109-23.
104. Lopez S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 2004;12:271-8.
105. Guerrero CA, Bouyssouade D, Zarate S, et al. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* 2002;76:4096-102.
106. Guerrero CA, Zarate S, Corkidi G, Lopez S, Arias CF. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* 2000;74:9362-71.
107. Isa P, Realpe M, Romero P, Lopez S, Arias CF. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 2004;322:370-81.
108. Ciarlet M, Ludert JE, Iturriza-Gomara M, et al. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J Virol* 2002;76:4087-95.
109. Ciarlet M, Estes MK. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 4):943-8.
110. Mendez E, Lopez S, Cuadras MA, Romero P, Arias CF. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* 1999;263:450-9.
111. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 1988;62:1136-44.
112. Pando V, Isa P, Arias CF, Lopez S. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 2002;295:190-200.

113. Espejo RT, Lopez S, Arias C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J Virol* 1981;37:156-60.
114. Arias CF, Lizano M, Lopez S. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J Gen Virol* 1987;68 (Pt 3):633-42.
115. del Pozo MA, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Serrador JM, Sanchez-Madrid F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1999;29:3609-20.
116. Kittler R, Heninger AK, Franke K, Habermann B, Buchholz F. Production of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for gene silencing in mammalian cells. *Nat Methods* 2005;2:779-84.
117. Kittler R, Surendranath V, Heninger AK, et al. Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat Methods* 2007;4:337-44.
118. Gutierrez M, Isa P, Sanchez-San MC, et al. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: The role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2010.
119. Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R, et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* 2003;77:7254-60.
120. Bass DM, Baylor M, Chen C, Upadhyayula U. Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology* 1995;212:429-37.
121. Droese S, Altendorf K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* 1997;200:1-8.
122. Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 1994;269:21-4.
123. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El AJ, et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 2006;8:124-36.
124. Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2002;277:3371-9.
125. Johannsdottir HK, Mancini R, Kartenbeck J, Amato L, Helenius A. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J Virol* 2009;83:440-53.
126. Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* 1998;72:3455-8.
127. Royle SJ, Lagnado L. Trimerisation is important for the function of clathrin at the mitotic spindle. *J Cell Sci* 2006;119:4071-8.

128. Nicoziani P, Vilhardt F, Llorente A, et al. Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol Biol Cell* 2000;11:481-95.
129. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, Lopez S. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol* 2009;83:8819-31.
130. Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 2006;80:9031-8.
131. Girao H, Geli MI, Idrissi FZ. Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett* 2008;582:2112-9.
132. Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* 1998;72:9645-55.
133. Loubery S, Wilhelm C, Hurbain I, Neveu S, Louvard D, Coudrier E. Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic* 2008;9:492-509.
134. Soldati T, Schliwa M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:897-908.
135. Ashok A, Atwood WJ. Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *J Virol* 2003;77:1347-56.
136. Sieczkarski SB, Whittaker GR. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* 2003;4:333-43.
137. Vonderheit A, Helenius A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* 2005;3:e233.
138. Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, et al. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol* 2007;81:4881-5.
139. Callaghan J, Nixon S, Bucci C, Toh BH, Stenmark H. Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem* 1999;265:361-6.
140. Barbero P, Bittova L, Pfeffer SR. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol* 2002;156:511-8.
141. Ganley IG, Carroll K, Bittova L, Pfeffer S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol Biol Cell* 2004;15:5420-30.
142. Rojas R, van VT, Mardones GA, et al. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 2008;183:513-26.
143. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247-69.

144. Ellis S, Mellor H. Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol* 2000;10:85-8.
145. Murphy C, Saffrich R, Grummt M, et al. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 1996;384:427-32.
146. Hoppe S, Schelhaas M, Jaeger V, Liebig T, Petermann P, Knebel-Morsdorf D. Early herpes simplex virus type 1 infection is dependent on regulated Rac1/Cdc42 signalling in epithelial MDCKII cells. *J Gen Virol* 2006;87:3483-94.
147. Li E, Stupack D, Bokoch GM, Nemerow GR. Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 1998;72:8806-12.
148. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol* 2004;78:11583-90.
149. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* 2007;81:8552-62.
150. Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 2000;74:2288-92.
151. Querbes W, Benmerah A, Tosoni D, Di Fiore PP, Atwood WJ. A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J Virol* 2004;78:250-6.
152. Mercer J, Knebel S, Schmidt FI, Crouse J, Burkard C, Helenius A. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9346-51.
153. Huang F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem* 2004;279:16657-61.
154. Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:605-14.
155. Cerione RA. Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol* 2004;14:127-32.
156. Babst M. A protein's final ESCRT. *Traffic* 2005;6:2-9.

XII. Anexos

Anexo 1. Artículo: Revisión de endocitosis como entrada de virus

Anexo 2. Artículo: Revisión de entrada de rotavirus

Anexo 3. Artículo: Caracterización de la entrada de las cuatro cepas

MECANISMOS DE ENTRADA DE VIRUS: UNA MANERA DE CONOCER A LA CÉLULA

Michelle Gutiérrez* y Susana López

Depto. de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular,
Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos,
México. C.P. 62210. E-mail*: mayret@ibt.unam.mx

RESUMEN

Los virus representan una versión microscópica del caballo de Troya, en la que hacen uso de procesos celulares para poder entrar a la célula e infectarla. La endocitosis es uno de estos procesos que los virus han aprovechado para poder ser internalizados. En esta revisión se presentan las distintas vías de endocitosis conocidas hasta el momento, así como ejemplos de distintos virus que utilizan cada ruta para ingresar a la célula.

Palabras Clave: Caveolas, clatrina, dinamina, endocitosis, entrada de virus.

ABSTRACT

Viruses represent a microscopic version of the Trojan horse by mimicking processes known to the cell to get inside and infect it. Endocytosis is one of these processes that viruses take advantage of to be internalized. In this review, the distinct endocytic pathways known to date are discussed. In addition, a brief overview of the entry of different viruses known to use each of these routes is provided.

Key Words: Caveolae, clathrin, dynamin, endocytosis, virus entry.

INTRODUCCIÓN

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos. Este proceso consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares como son la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis, tanto celular como del organismo completo.

Este proceso celular está constituido por una red de varios organelos los cuales difieren en su composición proteica y propiedades bioquímicas (Figura 1).

Existen diferentes rutas de endocitosis que son usadas por la célula para llevar a cabo distintas funciones (Figura 1)^{1,2}. Sin embargo, dados los avances metodológicos recientes, así como

la complejidad de este proceso, se siguen encontrando nuevas rutas cuya caracterización es aún incompleta.

Existen varios criterios para clasificar los diferentes tipos de endocitosis, éstos son: el tipo de molécula que se internaliza (toxina, virus, ligando, receptor), el componente que cubre la vesícula (clatrina, caveolina, flotilina, etc.), la participación de GTPasas en el proceso, el mecanismo de escisión de la vesícula de la membrana y la participación del citoesqueleto de actina, entre otros¹.

La presencia de las GTPasas de la familia Rab contribuye a la diferenciación entre los distintos tipos de endosomas. Estas GTPasas son importantes en la regulación del tráfico intracelular porque regulan la fusión de las vesículas a los endosomas. De manera general, la unión del ligando al receptor favorece la formación de la vesícula endocítica. Esta vesícula entrega su carga a los endosomas tempranos (o endosomas de distribución), organelos con un pH alrededor de 6 donde se localizan las Rab GTPasas 4 y 5. En los casos donde la molécula endocitada es un receptor unido a su ligando, el pH ácido puede promover la

Nota: Artículo recibido el 24 de mayo de 2010 y aceptado el 14 de junio de 2010.

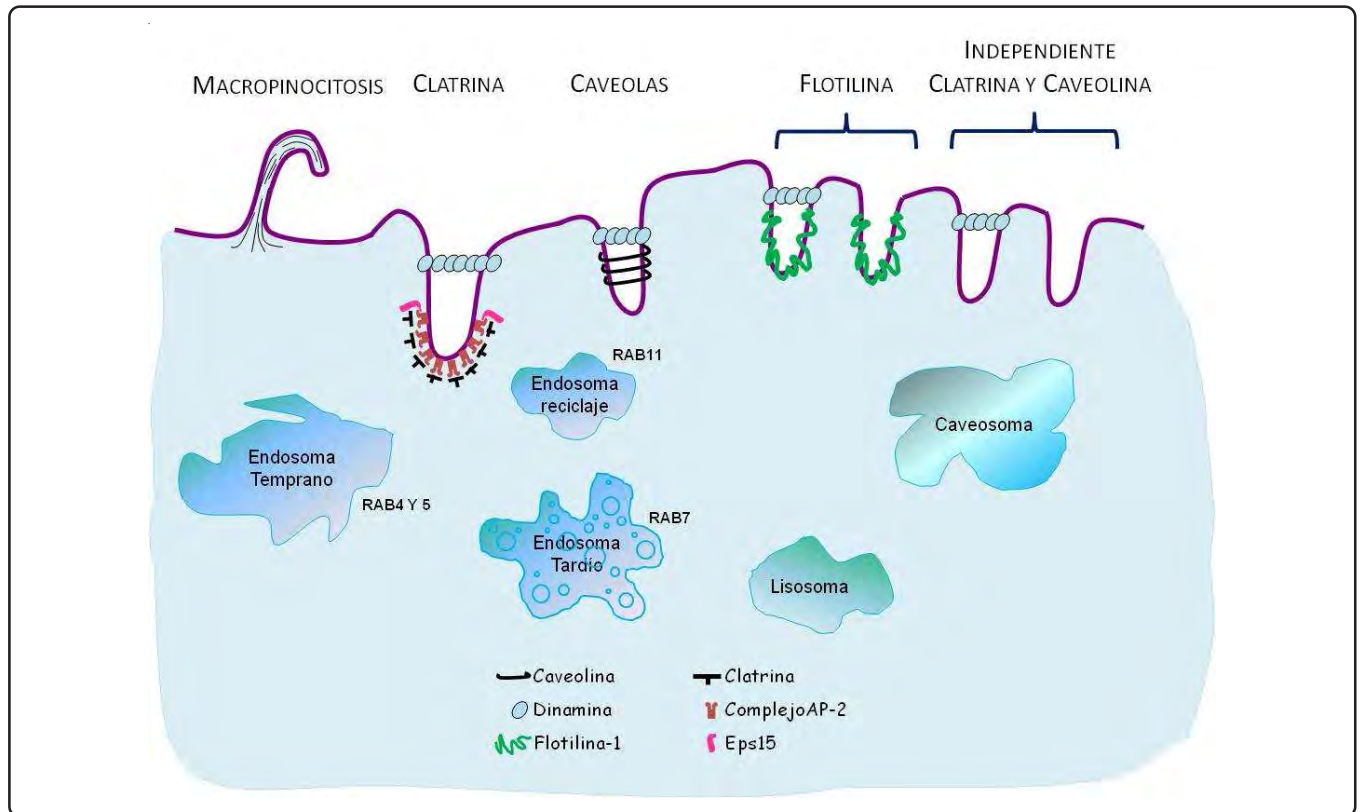


Figura 1. Esquema general de las diferentes rutas de endocitosis. Se muestran las distintas vías de endocitosis y la maquinaria molecular asociada a cada ruta.

disociación del ligando de su receptor. Usualmente, el ligando, el cual permanece en la vía, es degradado, mientras que el receptor entra a los endosomas de reciclamiento (donde está localizada Rab11) para regresar a la membrana celular. Las moléculas que son destinadas a su degradación o que requieren llegar al interior celular, cerca del núcleo, entran a los endosomas tardíos (también conocidos como cuerpos multivesiculares - MVBs-). En estos organelos, con un pH menor a 6, se localiza la GTPasa Rab 7. Finalmente, la molécula endocitada llega a los lisosomas donde puede ser degradada por enzimas que están activas en un ambiente ácido. En el transcurso de toda la ruta endocítica, existen posibles rutas de escape para evitar la degradación en los lisosomas (Figura 1).

A continuación se da una breve descripción de las rutas más conocidas hasta el momento que han sido clasificadas de acuerdo a las proteínas que recubren las vesículas endocíticas.

Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de moléculas a la célula. Este tipo de endocitosis requiere una serie de componentes estructurales para poder formar la vesícula de manera que pueda ser internalizada. Uno de estos componentes, y por el cual esta vía recibe su nombre, es la clatrina.

La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada "el trisqueleto" (triskelion) de clatrina³. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras, es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β 2, μ 2 y σ 2). El complejo AP-2 interactúa con clatrina, a través de la subunidad β 2, y estimula su polimerización generando una malla de clatrina que cubre la vesícula (Figura 2)⁴. Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta que se forma la vesícula endocítica. La fisión de la vesícula cubierta con clatrina es controlada por la GTPasa dinamina. Se ha propuesto que la dinamina actúa como una mecano-enzima la cual usa la hidrólisis de GTP para generar la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana (Figura 2)⁵.

Existen diferentes maneras de inhibir esta vía de endocitosis. Desde agentes químicos como sacarosa o clorpromazina hasta siRNAs o mutantes dominantes negativas de los componentes estructurales de la vía (Tabla I).

Endocitosis mediada por caveolas

La segunda vía de endocitosis mejor caracterizada es la mediada por caveolas. En esta ruta, las caveolinas son el principal componente estructural. A diferencia de clatrina que requiere

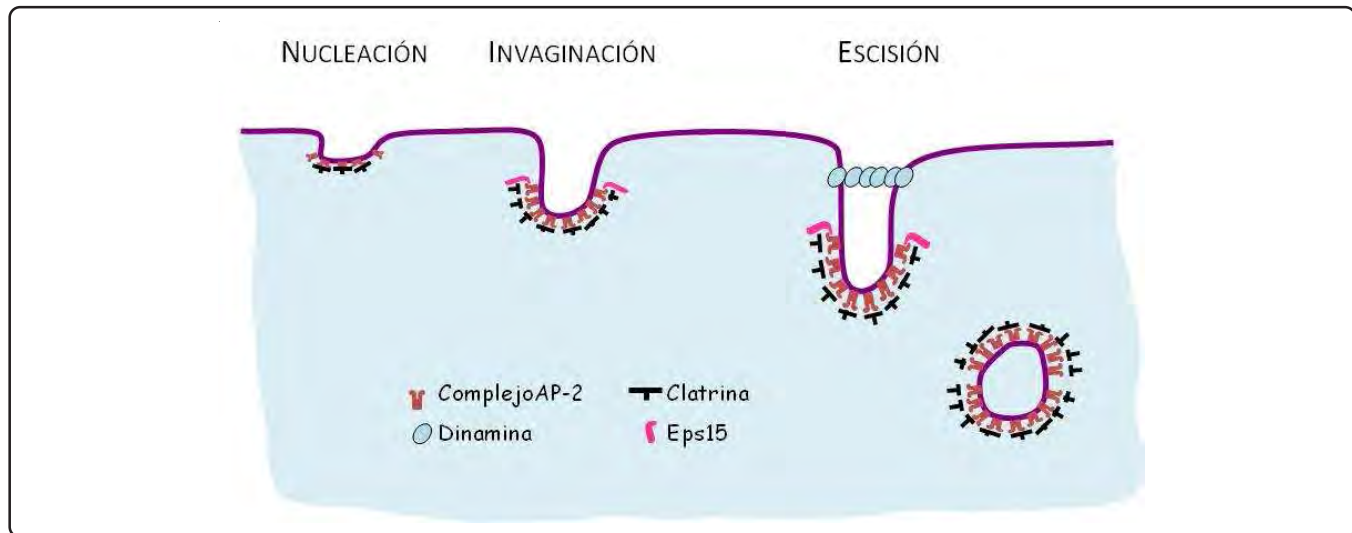


Figura 2. Formación de las vesículas de clatrina. Se muestran los pasos secuenciales involucrados en la endocitosis mediada por clatrina y algunos de los componentes claves que participan en cada etapa.

Vía	Inhibidor	Efecto	Observaciones
Dependiente de Clatrina	Clorpromazina	Inhibe el ensamble de la malla de clatrina ⁴³	Puede afectar la fluidez y permeabilidad de la membrana ⁴⁴
	Medio sin potasio/con sacarosa	Polimerización anormal de clatrina. Remueve las vesículas cubiertas de la membrana ^{45,46}	La disminución de potasio en el medio puede tener otros efectos como la inhibición del transporte de proteínas secretoras ⁴⁷
	Mutantes dominantes negativos de eps15	Evita el reclutamiento de AP-2 a la membrana celular, inhibiendo la formación de la malla de clatrina ⁴⁸	No inhibe aquellas vesículas con cubierta de clatrina que no dependen del complejo AP-2 ⁴⁹
	siRNAs cadena pesada de clatrina	Inhiben específicamente la expresión de clatrina ⁴³	
Dependiente de Caveola	Ciclodextrina	Secuestra el colesterol de la membrana ³⁹	Puede provocar efectos no específicos ⁵⁰
	Mutante dominante negativa de caveolina	Inhibe la asociación de la caveolina a las balsas lipídicas ⁵¹	
	siRNAs caveolina	Inhibe específicamente la expresión de caveolina ³⁹	
Macropinocitosis	Citocalasina D	Previene la polimerización de actina ^{52,53}	Puede inhibir la entrada de moléculas que entran por otras rutas de endocitosis ⁵⁴
	Amilorida	Inhibe intercambiadores Na^+/H^+ ¹³	Inespecífico ⁵⁵
	Toxina B de <i>C. difficile</i>	Inhibe a las GTPasas Rac, Cdc42 y Rho ⁵⁶	Las Rho GTPasas pueden participar en otras vías ^{15,17}

Tabla I. Estrategias usadas para el estudio de los distintos componentes y vías de la endocitosis.

proteínas accesorias para ser reclutada a la membrana, las caveolinas son proteínas integrales que están asociadas a microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos también llamados balsas lipídicas⁶. La formación de la caveola depende de la expresión de caveolina-1 en células no musculares y de caveolina-3 en células de músculo⁶. Estas proteínas forman oligómeros que cubren las vesículas, las cuales son liberadas de la membrana plasmática, a través de la acción de dinamina, a estructuras llamadas caveosomas presentes en el interior de la célula (Figura 1)⁷. La ausencia de marcadores para endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje indica que estas estructuras representan un nuevo tipo de organelos⁷. A diferencia de los endosomas, estos organelos tienen pH neutro.

El tratamiento de las células con genisteína, un inhibidor de tirosin cinasas extraído de la soya, bloquea la invaginación de las caveolas⁸. Se sabe que la cinasa Src fosforila a la caveolina-1 en la tirosina 14 y esto incrementa la dinámica de las caveolas. En la Tabla I se muestran otras maneras diferentes para inhibir esta vía.

Macropinocitosis

A diferencia de las otras vías de endocitosis, la macropinocitosis involucra la remodelación de grandes extensiones de la membrana plasmática a través de cambios en el citoesqueleto de actina lo que culmina con la internalización de fluido en grandes vacuolas llamadas macropinosomas (Figura 1)^{9,10}. Éste es un proceso transitorio comúnmente inducido por factores de crecimiento que activan receptores de tirosin cinasas promoviendo cascadas de señalización que inducen cambios en el citoesqueleto de actina y en la membrana plasmática.

Entre las proteínas involucradas en el proceso de regulación de la macropinocitosis se encuentran las GTPasas Rac y Cdc42 las cuales activan a la cinasa PAK1 encargada de regular la dinámica del citoesqueleto de actina¹¹. Además, PAK1, cinasa que fosforila serinas y treoninas, activa a la proteína CtBP1 que es necesaria para que se cierre el macropinosoma¹². La inhibición de los intercambiadores Na⁺/H⁺ por amilorida o derivados de ésta, bloquean esta vía¹³. Además, agentes que alteran la polimerización del citoesqueleto de actina y mutantes dominantes negativos de Rac, Cdc42 o PAK1, también afectan este mecanismo de endocitosis^{13,14}. Es importante mencionar que estas proteínas tienen otras funciones en la célula y es necesario combinar estrategias experimentales para asegurar que el cargo en particular que se está estudiando utiliza esta vía de entrada (Tabla I).

Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

Algunas vías de endocitosis han sido parcialmente caracterizadas recientemente y se han observado que son independientes tanto de clatrina como de caveolina y, sin embargo, pueden o no depender de dinamina¹.

Por ejemplo, la internalización del receptor de la interleucina 2 (IL-

2) se caracteriza por su independencia a clatrina y caveolina, su dependencia a dinamina y a colesterol. Además, el uso de mutantes dominantes negativos de la GTPasa RhoA, encargada de la remodelación del citoesqueleto de actina, demostró que esta vía está regulada por esta enzima¹⁵. La endocitosis del receptor de citocinas γ c, que requiere de la polimerización de actina, también se lleva a cabo de esta manera¹⁶.

Un ejemplo de cargos que entran por una vía independiente de dinamina son las proteínas ancladas a glicosil-inositol-fosfato (GPI). En general, las proteínas ancladas a GPI entran a la célula por esta vía y son dirigidas a compartimentos endosomales tempranos enriquecidos en proteínas ancladas a GPI, GEECs (por sus siglas en inglés de GPI-AP enriched early endosomal compartments)¹⁷. Los GEECs son compartimentos endosomales distintos, que no colocalizan con caveolina. La inhibición de la endocitosis mediada por clatrina, y el uso de mutantes de dinamina, no inhiben la internalización de estas proteínas. La expresión de una dominante negativa de la GTPasa cdc42 sí inhibe esta vía¹⁷.

A principios del 2006, Glebov *et al.*, encontraron que flotilina-1, una proteína marcadora de balsas lipídicas, participa en una nueva vía de endocitosis (Figura 1)¹⁸. Esta novedosa ruta fue caracterizada por la internalización de proteínas asociadas a glicosilfosfatidilinositol (específicamente, CD59-GPI). Estos investigadores encontraron que estas proteínas entran a la célula a través de una vía que es dependiente de flotilina pero independiente de clatrina, caveolina y dinamina¹⁸. Por otro lado, Payne *et al.*, mediante el uso de drogas, RNAi y la expresión transitoria de proteínas descubrieron que la entrada de los proteoglicanos es independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina¹⁹. Además, encontraron que estas moléculas y sus ligandos entran directamente a los endosomas tardíos dado que los complejos (proteoglicanos y sus ligandos catiónicos) colocalizan con Rab9 pero no con Rab5¹⁹.

Endocitosis como vía de entrada de virus

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios formados por una cubierta proteica (cápside) que rodea el material genético. Algunos virus tienen además, una envoltura lipídica proveniente de la célula que infectó previamente rodeando su cápside. El ciclo replicativo de cualquier virus comienza con la unión de éste a sus receptores (entre ellos integrinas, gangliósidos, glicoproteínas, etc.) lo cual provoca cambios en la partícula viral que favorecen las siguientes etapas. Una vez que el virus ha reconocido a sus receptores, el siguiente paso es la penetración de la membrana celular. Este paso puede darse a nivel de la membrana plasmática o en membranas intracelulares de diferentes organelos dependiendo de los requerimientos de cada virus. Muchos virus utilizan las vías de endocitosis para entrar a la célula, mientras que pocos atraviesan directamente la membrana celular por un mecanismo llamado penetración

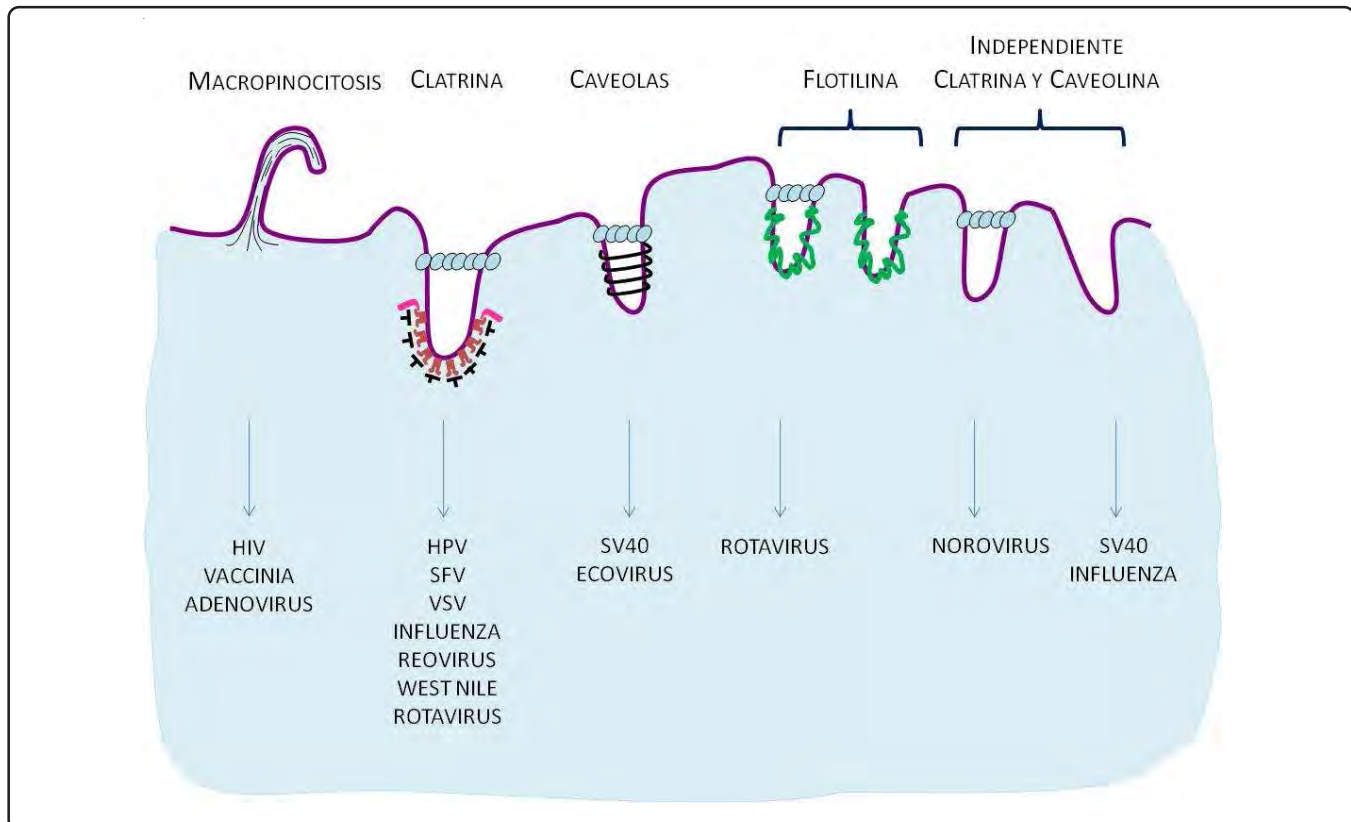


Figura 3. Se muestran las distintas vías de endocitosis y los virus que utilizan cada una de éstas. Ejemplos de virus que entran por macropinocitosis son: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), vaccinia y algunos serotipos de adenovirus. Dentro de los virus que entran por una vía dependiente de clatrina están: VPH (virus del papiloma humano), VSV (virus de la estomatitis vesicular), reovirus, influenza y algunas cepas de rotavirus. SV40 (virus de simio que produce vacuolas 40) y ecovirus son representantes de la endocitosis mediada por caveolas, mientras que la cepa de simio RRV de rotavirus entra a la célula por una vía independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina. Recientemente, se encontró que norovirus usa una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina. Finalmente, se ha reportado que influenza y SV40 también utilizan una vía independiente de clatrina, caveolina y dinamina.

directa (Figura 3). Cabe señalar que la jornada de un virus no termina cuando llega al interior de la célula, a partir de ese momento, la partícula viral requiere desnudarse, es decir, liberar el genoma viral para que pueda ser replicado o traducido. Finalmente, las proteínas virales se ensamblan para generar nuevas partículas virales que salen de la célula y son capaces de infectar a otras células.

En esta revisión nos enfocaremos a la entrada viral que es la primera etapa del ciclo replicativo de un virus. Específicamente, nos referiremos a las distintas rutas endocíticas que utilizan los virus para ingresar a la célula. Esta fase inicia desde que el virus se une a sus receptores celulares hasta que llega a su sitio de replicación, el cual puede ser desde el citoplasma hasta el núcleo. Este proceso involucra varios pasos (unión, penetración y desnudamiento de la partícula viral) y en el que es necesaria una cápside metaestable que, por un lado, sea resistente para sobrevivir en ambientes extracelulares y que, por otro lado, sea fácil de desensamblarse una vez llegado al sitio apropiado de replicación para liberar su material genético.

La entrada de un virus utilizando el proceso endocítico de la célula le da varias ventajas. Primero, evita la barrera del citoesqueleto de actina cortical que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana plasmática y forma una malla difícil de atravesar. Y por otra parte, le da acceso a los organelos endocíticos los cuales proveen de micro-ambientes que favorecen la penetración viral. Las proteasas endosomales o el bajo pH de estos organelos son algunos de los recursos más usados por los virus para facilitar procesos tales como el desnudamiento de la partícula.

¿Cómo se puede estudiar la entrada de los virus?

Es posible ver directamente a los virus mediante el microscopio electrónico o a través de microscopía de fluorescencia y se puede evaluar el papel de la inhibición de alguna vía de endocitosis en particular sobre la entrada del virus. Es factible marcar la envoltura, las proteínas o el genoma viral con compuestos fluorescentes lo que permite seguir a los virus así marcados durante su entrada en células vivas. Sin embargo, uno de los problemas que hay con este tipo de enfoque es que no es posible distinguir cuáles de las

partículas virales que entran a la célula son infecciosas y, por lo tanto, dan una infección productiva y cuáles no son infecciosas, por lo que no llevan a cabo una infección productiva. Éste no es un problema menor, ya que normalmente hay un gran número de partículas virales que no son "funcionales", este número puede llegar a ser como de 1:100 ó 1:10,000 donde hay una partícula infecciosa por cada cien o hasta diez mil partículas que son defectuosas. Al observar estas partículas por microscopía no es posible distinguirlas y, por consiguiente, no es posible determinar sólo con este método la vía de entrada productiva que utiliza un determinado virus.

Otra manera que permite evitar este problema es evaluar el efecto que tienen los inhibidores de endocitosis sobre la producción de proteína viral o sobre la replicación del genoma viral. Éste es el enfoque más usado en virus cuya proporción de partículas físicas *versus* infecciosas es alta, ya que permite estar más seguro de que se está determinando la vía de endocitosis que usan las partículas infecciosas.

Existen varios ejemplos de virus que utilizan las diferentes rutas de endocitosis para ingresar a la célula y a continuación daremos una breve descripción de los ejemplos más conocidos.

Endocitosis mediada por clatrina: mecanismo muy socorrido por los virus

La endocitosis mediada por clatrina es uno de los mecanismos más utilizados entre los virus (Figura 3). Esta vía es utilizada por virus de diferentes familias como son el virus de la estomatitis vesicular, papilomavirus y el virus del Nilo, entre otros²⁰⁻²². Virus de gran impacto médico como son el de influenza o el del dengue también entran a la célula por este mecanismo^{23,24}. En general, las moléculas -incluidos los virus- que entran a la célula por endocitosis mediada por clatrina están expuestas al ambiente ácido de los endosomas y pueden responder al bajo pH sufriendo cambios conformacionales. En el caso de los virus, estos cambios conformacionales permiten la exposición de péptidos de fusión los cuales a su vez interactúan con la membrana del endosoma facilitando su liberación al citosol. Dependiendo del pH que se requiera para provocar el cambio conformacional, el sitio de penetración de los virus puede ser los endosomas tempranos (que tienen un pH 6.5 a 6.0), tardíos (pH 6.0 a 5.5) e inclusive los lisosomas (pH 5.5 a 4). Un ejemplo de un virus que sufre una fusión catalizada por un ambiente ácido es el virus de influenza. En la superficie celular, el virus se une a receptores que tienen ácido siálico a través de las cabezas globulares de la glicoproteína viral hemaglutinina (HA). El virus es entonces internalizado vía la endocitosis mediada por clatrina y el bajo pH de los endosomas tardíos provoca cambios conformacionales en las cabezas globulares de la proteína HA. Esto expone al péptido de fusión el cual es una región altamente hidrofóbica de la proteína. Además, estos cambios lo acercan a la membrana del endosoma con lo cual la fusión de la membrana viral con la endosomal se puede llevar a cabo y el genoma viral es liberado

al citoplasma. Si los cambios conformacionales se inducen antes de que el virus sea internalizado, mediante un tratamiento de las partículas virales con pH ácido, por ejemplo, el virus se inactiva y pierde su infectividad²⁵.

Por otro lado, en algunos casos el pH ácido no es suficiente para inducir algún cambio conformacional necesario para facilitar la fusión de la partícula viral con el endosoma. Se ha reportado que algunos virus son activados a través de cortes proteolíticos que son llevados a cabo por proteasas endosomales, como las catepsinas (que son proteasas cuya actividad depende de pH). En este caso el pH endosomal es necesario para activar a la proteasa endosomal que al cortar alguna proteína viral promueve el cambio conformacional de la partícula viral, lo que favorece a su vez la penetración al citoplasma celular^{26,27}.

Endocitosis mediada por caveolas

Existen varios virus que pueden entrar por la ruta dependiente de caveolina como son el virus de la leucemia murina, ecovirus y SV40, entre otros (Figura 3)²⁸⁻³⁰.

En el caso de SV40, un virus de DNA que tiene el potencial de causar tumores, su infectividad se ve disminuida cuando se trata a las células con drogas como la nistatina, que inhiben esta vía²⁸. Asimismo, la expresión de una mutante dominante negativa de dinamina (defectuosa en su actividad de GTPasa) inhibe la entrada de este virus⁸, lo que sugiere que SV40 entra a la célula por una vía dependiente de caveolina y dinamina. Continuando la caracterización de la vía de entrada, Pelkmans *et al.*, demostraron que inhibidores de tirosín cinasas como la genisteína bloquean la internalización de este virus⁸. Además, SV40 requiere un citoesqueleto de actina dinámico dado que inhibidores de la polimerización de actina afectan su infectividad⁸. La ruta de entrada de SV40 es bastante inusual, este virus después de ser internalizado por la vía dependiente de las caveolas es llevado a organelos celulares neutros llamados caveosomas (Figura 1) y de ahí es transportado al retículo endoplasmático donde la partícula viral es desensamblada por enzimas de la maquinaria del plegamiento de proteínas^{31,32}. Al ser un virus de DNA, el sitio de replicación de este virus es el núcleo de la célula. Aún se desconoce el mecanismo que utiliza este virus para llegar hasta este organelo.

Macropinocitosis

Recientemente, Mercer *et al.*, encontraron que vaccinia, un virus de DNA envuelto que es responsable de la viruela en las vacas y que se replica en el citosol, entra por macropinocitosis (Figura 3). En este trabajo, siguieron la entrada de vaccinia usando tanto partículas virales como proteínas celulares marcadas con fluoróforos y mostraron que este virus se asocia a filopodios, estructuras tipo dedo formadas por el citoesqueleto de actina que se proyectan del cuerpo de la célula. Siguiendo el paso de vaccinia, los autores vieron que este virus utiliza este tipo de estructuras para acercarse al

cuerpo de la célula y una vez en la membrana plasmática, el virus es literalmente engullido. Inhibidores del citoesqueleto de actina, tratamientos con amilorida que es un inhibidor de los intercambiadores Na^+/H^+ y mutantes dominantes negativas de Rac1 y PAK1 reducen la infección¹⁴.

Otros virus como adenovirus, virus de DNA no envueltos que infectan principalmente las vías respiratorias, también utilizan la macropinocitosis para entrar a la célula. La unión de estos virus a su receptor activa Rac1, además, microscopías electrónicas muestran que el virus se asocia a vacuolas grandes y sin cubierta. Inhibidores del citoesqueleto de actina y de los intercambiadores Na^+/H^+ bloquean la infección; el virus también activa CtBP1 para cerrar los macropinosomas con adenovirus en ellos³³. En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus envuelto con genoma de RNA, se ha reportado que entra por diferentes vías dependiendo del tipo de célula. Sin embargo, la macropinocitosis ha sido sugerida como su mecanismo de entrada en los macrófagos humanos³⁴. Esta observación se sustenta en la presencia del virus detectada por microscopía electrónica en macropinosomas y la inhibición de su entrada por drogas que evitan la formación de ruffles (extensiones de membrana generadas por la remodelación del citoesqueleto de actina), tales como amilorida³⁴.

Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

En el caso de virus internalizados por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de dinamina se encuentra rotavirus, un virus causante de diarrea severa en niños menores de 2 años. Este virus no envuelto está formado por tres capas concéntricas de proteína. La capa más externa tiene un papel muy importante en la infectividad viral, ya que está involucrada tanto en la unión como en la entrada de rotavirus.

Para entrar a la célula, los rotavirus requieren de varios pasos³⁵. El primero, es su activación por tripsina. Una vez activado, el virus se une a la célula blanco a través del reconocimiento de receptores presentes en la superficie celular. La presencia de dichos receptores determina en gran medida qué tipo celular puede infectar un virus. Se sabe que para los rotavirus, el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha x \beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ y la proteína de choque térmico Hsc70 están involucradas como sus receptores³⁵. En la entrada de rotavirus a la célula se ha sugerido la participación de los microdominios lipídicos (también conocidos como balsas lipídicas), ya que hay una severa disminución en la infectividad al remover el colesterol de la membrana (lo que resulta en la desestabilización de las balsas lipídicas)^{36,37}. La presencia de las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$, de la proteína Hsc70, así como de las partículas virales infecciosas en balsas lipídicas, apoyan la idea de que éstas son importantes en la entrada de rotavirus³⁸. Con respecto al mecanismo de entrada, se ha demostrado mediante el uso de drogas y de dominantes negativas (de eps15, caveolina-1 y dinamina-2), que la entrada de la cepa de rotavirus RRV es independiente tanto de la endocitosis mediada por

clatrina como la de caveolina y, sin embargo, depende de dinamina, una proteína involucrada en la liberación de la vesícula de la membrana plasmática³⁷. Estudios recientes sugieren que esta cepa de rotavirus pudiera estar utilizando una vía dependiente de flotilina y dinamina para entrar (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar).

A inicios de este año, se reportó que el norovirus murino 1, un virus causante de gastroenteritis, entra por una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina (Figura 3)³⁹. Mediante el uso de agentes químicos y mutantes dominantes negativas también fue excluida la macropinocitosis como mecanismo de entrada para este virus.

Los virus pueden entrar a la célula utilizando diferentes rutas

Inicialmente se pensó que cada familia de virus utilizaba una sola vía de entrada para infectar diferentes tipos celulares. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que un mismo tipo de virus puede entrar por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular^{40,41}.

Como se mencionó anteriormente, el representante típico de la endocitosis mediada por clatrina es el virus de influenza²⁴. Sin embargo, se ha encontrado que en células HeLa este virus no es afectado por drogas o mutantes dominantes negativas que inhiben tanto las vías de endocitosis mediadas por clatrina, como las mediadas por caveolina, sugiriendo que influenza puede entrar también por una vía independiente de clatrina y dinamina (Figura 3)⁴¹. Virus que entran por endocitosis mediada por caveolas como SV40 también pueden tener otras vías de entrada³¹. En el 2005, Damm *et al.*, demostraron que este virus puede entrar en células sin caveolina y utilizar una vía que es independiente tanto de caveolina como de clatrina y de dinamina (Figura 3)⁴⁰. A pesar de utilizar diferentes mecanismos de endocitosis para ser internalizado, SV40 mantiene su dependencia por el colesterol y el requerimiento por las cinasas de tirosina en ambas vías de entrada^{31,40}.

Por otro lado, se ha encontrado que cepas de rotavirus que presentan diferentes requerimientos por los receptores de membrana podrían entrar por distintas vías endocíticas (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar). En este trabajo, se evaluó el papel de las vías de endocitosis mejor caracterizadas (la dependiente de clatrina, de caveolina y la macropinocitosis) en la entrada de varias cepas mediante el uso de agentes químicos, siRNAs y mutantes dominantes negativas. Además, se determinó la dependencia del proceso de entrada por el pH endosomal. Los resultados obtenidos muestran que sin importar las interacciones con los receptores, las cepas pueden entrar por vías distintas entre ellas la endocitosis mediada por clatrina y/o la dependiente de flotilina (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar).

CONCLUSIONES

Debido a su tamaño (que puede ser 100,000 veces más pequeño que una célula), los virus dependen de toda la maquinaria celular para su replicación y, por lo tanto, han desarrollado estrategias para aprovechar al máximo los recursos de su huésped. Es por esto que la caracterización del ciclo replicativo de los virus representa una fuente de conocimiento sin precedentes.

A través de la caracterización de las rutas de entrada de los virus, éstos han contribuido enormemente a la comprensión del funcionamiento de la célula. Varias de las vías de endocitosis aquí descritas se descubrieron gracias al estudio de los mecanismos de entrada utilizados por los virus. Detalles de la formación de las vesículas cubiertas por clatrina han sido descubiertos usando virus como reovirus, influenza y dengue^{23,24,42}.

En sí mismos estos agentes infecciosos son fascinantes pero a la vez, su alta adaptabilidad y especificidad por el tipo celular que infectan, los hacen una herramienta molecular muy útil.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por las becas 55005515 del Instituto Médico Howard Hughes, IN210807 de DGAPA-UNAM, y la 60025 de CONACyT. Michelle Gutiérrez es becaria de CONACyT.

REFERENCIAS

1. Mayor, S. & Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603-612 (2007).
2. Marsh, M. & Helenius, A. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**, 729-740 (2006).
3. Royle, S.J. The cellular functions of clathrin. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1823-1832 (2006).
4. Traub, L.M. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 583-596 (2009).
5. Takei, K. & Haucke, V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* **11**, 385-391 (2001).
6. Krajewska, W.M. & Maslowska, I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol. Biol. Lett.* **9**, 195-220 (2004).
7. Pelkmans, L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 295-304 (2005).
8. Pelkmans, L., Puntener, D., & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-539 (2002).
9. Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510-520 (2009).
10. Kerr, M.C. & Teasdale, R.D. Defining macropinocytosis. *Traffic.* **10**, 364-371 (2009).
11. Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.V., & Simons, M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 3189-3199 (2004).
12. Liberali, P. *et al.* The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* **27**, 970-981 (2008).
13. Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**, 547-563 (2010).
14. Mercer, J. & Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535 (2008).
15. Lamaze, C. *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7**, 661-671 (2001).
16. Sauvonnnet, N., Dujeancourt, A., & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammacytokine receptor. *J. Cell Biol.* **168**, 155-163 (2005).
17. Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., & Mayor, S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell* **2**, 411-423 (2002).
18. Glebov, O.O., Bright, N.A., & Nichols, B.J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 46-54 (2006).
19. Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., & Zhuang, X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic.* **8**, 389-401 (2007).
20. Chu, J.J. & Ng, M.L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* **78**, 10543-10555 (2004).
21. Day, P.M., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1-11 (2003).
22. Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., & Whittaker, G.R. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**, 53-60 (2005).
23. Van der Schaar, H.M. *et al.* Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS. Pathog.* **4**, e1000244 (2008).
24. Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., & Zhuang, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 567-573 (2004).
25. Puri, A., Booy, F.P., Doms, R.W., White, J.M., & Blumenthal, R. Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. *J. Virol.* **64**, 3824-3832 (1990).
26. Chandran, K., Sullivan, N.J., Felbor, U., Whelan, S.P., & Cunningham, J.M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643-1645 (2005).
27. Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., & Dermody, T.S. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 24609-24617 (2002).
28. Anderson, H.A., Chen, Y., & Norkin, L.C. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1825-1834 (1996).
29. Beer, C., Andersen, D.S., Rojek, A., & Pedersen, L. Caveola-dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* **79**, 10776-10787 (2005).
30. Marjomaki, V. *et al.* Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* **76**, 1856-1865 (2002).
31. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**, 473-483 (2001).

32. Schelhaas, M. *et al.* Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* **131**, 516-529 (2007).
33. Amstutz, B. *et al.* Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* **27**, 956-969 (2008).
34. Marechal, V. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* **75**, 11166-11177 (2001).
35. Isa, P., Gutiérrez, M., Arias, C.F., & López, S. Rotavirus cell entry. *Future Virology* **3**, 135-146 (2008).
36. Guerrero, C.A., Zarate, S., Corkidi, G., López, S., & Arias, C.F. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**, 9362-9371 (2000).
37. Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F., & López, S. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**, 2310-2318 (2004).
38. Isa, P., Realpe, M., Romero, P., López, S., & Arias, C.F. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**, 370-381 (2004).
39. Perry, J.W. & Wobus, C.E. Endocytosis of Murine Norovirus 1 (MNV-1) into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J. Virol.* (2010).
40. Damm, E.M. *et al.* Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**, 477-488 (2005).
41. Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **76**, 10455-10464 (2002).
42. Ehrlich, M. *et al.* Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605 (2004).
43. Blanchard, E. *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964-6972 (2006).
44. Maruoka, N. *et al.* Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: A dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**, 178-186 (2007).
45. Hansen, S.H., Sandvig, K., & van Deurs, B. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* **121**, 61-72 (1993).
46. Heuser, J.E. & Anderson, R.G. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**, 389-400 (1989).
47. Judah, J.D., Howell, K.E., Taylor, J.A., & Quinn, P.S. Potassium depletion inhibits the intracellular transport of secretory proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **92** (Pt 2), 173-185 (1989).
48. Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., & Dautry-Varsat, A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 9), 1303-1311 (1999).
49. Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N., & Robinson, M.S. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**, 909-918 (2003).
50. Subtil, A. *et al.* Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6775-6780 (1999).
51. Trouet, D., Hermans, D., Droogmans, G., Nilius, B., & Eggermont, J. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 461-465 (2001).
52. Peterson, J.R. & Mitchison, T.J. Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* **9**, 1275-1285 (2002).
53. Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R., & Bubb, M.R. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 18-37 (1999).
54. Misinzo, G. *et al.* Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* **86**, 2057-2068 (2005).
55. García, M.L. *et al.* Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 3763-3771 (1990).
56. Genth, H., Dreger, S.C., Huelsenbeck, J., & Just, I. Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 592-597 (2008).

Rotavirus cell entry

**Pavel Isa,
Michelle Gutiérrez,
Carlos F Arias &
Susana López†**

†Author for correspondence
UNAM, Instituto de
Biotecnología,
Avenida Universidad 2001,
Colonia Chamilpa,
Cuernavaca, Morelos
62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1615;
Fax: +52 777 317 2388;
susana@ibt.unam.mx

The initial steps of viral infection involve the specific attachment of the viral particle to receptor(s) on the cell surface, followed by internalization of the virus into the cell and the subsequent uncoating of the virion to release the transcriptionally active particle. These events are essential for the successful initiation of a virus replication cycle and play an important role in tissue tropism and pathogenesis of viruses. Rotaviruses, the leading cause of severe childhood diarrhea, principally infect the mature enterocytes of the villi of the small intestine. Several cell-surface molecules have been implicated in the early interactions of rotavirus with its host cell, including sialic acid, various integrins, heat shock protein 70 and gangliosides. However, the mechanism by which rotaviruses enter cells is controversial, and both direct membrane penetration and endocytosis have been proposed. Recently developed molecular and biochemical tools have allowed the characterization of new endocytic pathways in mammalian cells. The description of these new pathways led us to review and discuss the available data on rotavirus cell entry.

Rotaviruses are the leading etiologic agents of severe diarrheal disease in infants and young children, being responsible for an estimated incidence of 600,000 annual deaths globally, and placing a significant economic burden on the global healthcare system [1]. Two live-attenuated vaccines have recently been licensed, however, previous experience with the first licensed rotavirus vaccine, which after being released in 1998 was withdrawn from the market a year later owing to a possible correlation between vaccine application and the occurrence of intussusception [2,3], has reinforced the need to develop alternative approaches to control rotavirus infection. Fundamental to these developments is a deep understanding of the molecular basis by which rotaviruses enter their host cells.

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are nonenveloped viruses, 100 nm in diameter, with a genome composed of 11 segments of dsRNA. The genome is enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. The innermost layer, formed by viral protein (VP)2, contains the viral genome and small amounts of the viral RNA polymerase VP1 and the guanylyl-transferase VP3; these viral elements constitute the core of the virus. The addition of VP6 on top of the core produces double-layered particles (DLPs). The outermost layer, present in infectious triple-layered particles (TLPs), is composed of two proteins, VP4 and VP7. The smooth external surface of the virus is formed by glycoprotein VP7, while the spike-like structures consist of VP4 [4]. VP4 and VP7 are responsible for

the initial interactions of the viral particle with the host-cell receptors and these proteins are also involved in the steps that lead to virus entry [5]. After binding to the cell surface, the virus must penetrate the plasma membrane to effectively infect the cell. This penetration is increased by, and most probably depends on, trypsin treatment of the virus, which results in the specific cleavage of VP4 into polypeptides VP8 and VP5 [4,6].

There has been great progress in the identification and characterization of rotavirus receptors in recent years (Table 1). Readers are encouraged to read some of the extensive reviews on the subject [5,7], since only a basic description of these receptors will be presented here. It has been proposed that rotavirus cell entry is a multistep process, which involves the two virus surface proteins and several cellular molecules, including sialic acids (SAs), integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha x\beta 2$, the heat shock cognate protein (hsc)70, and some gangliosides (reviewed in [5,7,8]). Differing sensitivity of rotavirus strains to treatment of cells with neuraminidase (NA; enzyme that removes the external SA from glycoproteins and gangliosides), led to the initial classification of rotaviruses into NA-sensitive and NA-resistant strains [9,10]. More recently, the characterization of viral strains whose infectivity is not inhibited by anti-integrin antibodies suggested the existence of rotavirus strains that are integrin independent [11]. The participation of various cell-surface molecules during rotavirus cell entry suggests that in this process the surface capsid proteins interact sequentially with several of these molecules [5],

Keywords: caveolin, clathrin, conformational change, direct penetration, endocytosis, gangliosides, integrins, membrane lipid microdomains, rafts, rotavirus, sialic acid, virus entry

future part of **medicine** **fsg**

Table 1. Cell-surface molecules involved in rotavirus cell entry.

Surface molecule	Rotavirus strain*	Assay	Cell line	Ref.
Sialic acid	Several animal strains	Infectivity after neuraminidase treatment of cells	MA104	[8,9]
Murine enterocyte glycoproteins	RRV	VOPBA	-	[91]
Gangliosides	OSU, KUN, MO, NCDV, UK and SA11	Binding and infectivity assays Binding in TLC plates	MA104 CHO-Lec2	[8,92–94]
Integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ and $\alpha v\beta 3$	Several strains	Infectivity assays; blocking with mAbs, ligands and peptides	MA104	[11,69,95–97]
Heat shock cognate protein 70	RRV, Wa and nar	Infectivity assays; blocking with mAbs and purified protein	MA104	[69,75,98]

*RRV and SA11 (simian origin); nar (neuraminidase-resistant mutant of RRV strain); OSU (porcine origin); KUN, MO and Wa (human origin); NCDV and UK (bovine origin).

mAb: Monoclonal antibody; TLC: Thin layer chromatography; VOPBA: Viral overlay protein blot assay.

and it is thought that these interactions cause conformational changes in the virus particles that may be crucial during cell membrane penetration [7,12]. The sequence of interaction events between the virus and the cell surface has been extensively characterized for the Simian rotavirus strain RRV (which is sensitive to NA) and the monkey kidney cell line MA104. Based on these studies, a model for the early interactions of rotavirus RRV with the host cell was suggested (reviewed in [5]). It has been proposed that the initial contact of the virus with the cell surface occurs through a SA-containing cell receptor, which uses the VP8 domain of VP4. This initial interaction of the virus with SA probably induces a subtle conformational change of VP4, which allows the virus to subsequently interact with integrin $\alpha 2\beta 1$ through VP5. After this second interaction, three more interactions take place, although their order of occurrence has not been established. These interactions occur between: VP5 and hsc70; VP7 and integrin $\alpha v\beta 3$; and VP7 and integrin $\alpha x\beta 2$. Independent of their order of occurrence, the various virus–receptor interactions most probably induce marked conformational changes in the viral proteins, which ultimately lead to the penetration and uncoating of the virus through a raft-mediated process.

Virus entry

While detailed information about the entry of several enveloped viruses is now available [13–15], the mechanism by which nonenveloped viruses enter cells is not well understood. Viral fusion proteins at the surface of enveloped viruses mediate apposition and fusion of the viral and cellular membranes, allowing the viral nucleocapsid to enter the cell. Whether this fusion event occurs at the cell surface or in an endosomal vesicle is

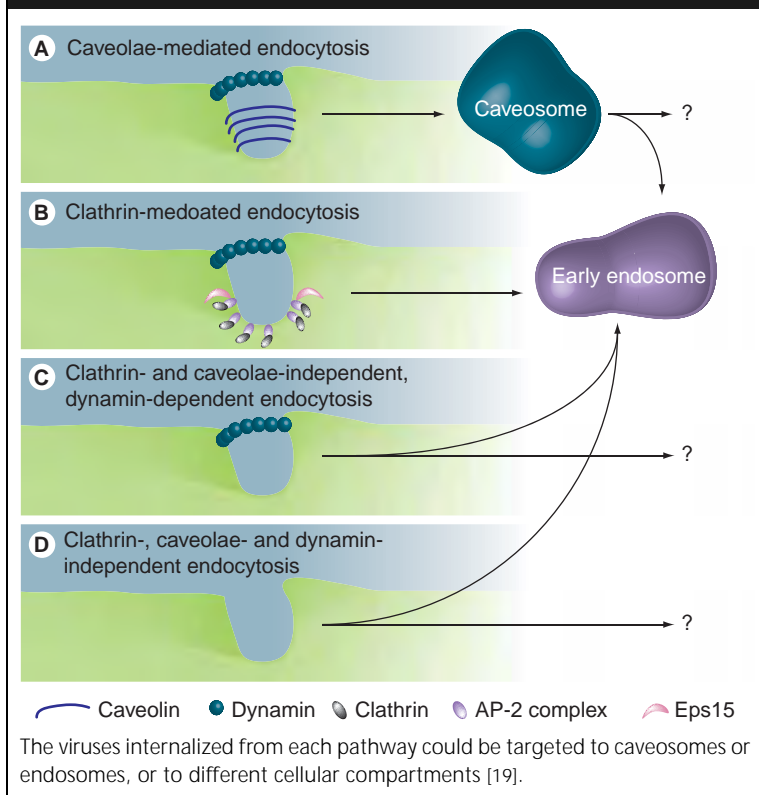
mostly determined by the optimum pH of the viral fusion protein [16–18]. The cell entry mechanism of nonenveloped viruses poses the problem that a large hydrophilic virus particle must traverse a lipid membrane without having the resource that enveloped viruses have, of fusing two lipid membranes. Two general mechanisms used by these viruses to reach the cell's cytoplasm have been described: direct penetration at the cell surface, during which the viral particles are directly translocated from the external milieu into the cytoplasm, or internalization into cellular compartments (e.g., endosomes).

The endocytic pathways used by different viruses include clathrin-mediated endocytosis, uptake via caveolae, macropinocytosis, and novel nonclathrin, noncaveolae pathways that have been recently described (Figure 1) [19,20]. The involvement of a particular virus entry pathway was initially based on the use of inhibitory drugs, which often have more than one target in the cell and thus provide limited information. Currently, more specific methods are available, such as the use of dominant-negative mutants, or inhibition of the expression of a specific protein by RNA interference. These techniques have become important tools to characterize the routes used by viruses to enter cells [19,20]. In light of the distinct endocytic pathways that have been recently described, it is important to critically reassess the previously published work on rotavirus entry.

Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity

In vivo, rotaviruses have a specific cell tropism, infecting primarily the mature enterocytes of the villi of the small intestine, which represents an environment with large amounts of proteolytic

Figure 1. Main endocytic pathways that viruses use to enter into the cell.



enzymes; therefore, it was not surprising to find that treatment of these viruses with trypsin results in the specific activation of their infectivity [21–24]. This activation is mediated by the cleavage of VP4 protein at three conserved arginine residues located at amino acid (aa) positions 231, 241 and 247, to yield polypeptides VP8 (aa 1–231) and VP5 (aa 248–776) [4,6,22]. The enhancement of infectivity of the Simian rotavirus strain SA11 4S correlates with cleavage at Arg 247, rather than at Arg 231 or 241 [6]. Cleavage must be in that precise aa since cleavage with other proteolytic enzymes, such as chymotrypsin, which cleaves at neighboring Asp 242 and Tyr 246, did not promote the enhancement of viral infectivity [6]. Further processing of VP5 at aa 259, 583 and possibly 467, was observed after additional trypsin treatment [25], although their relevance on the enhancement of infectivity is not clear. Trypsin cleavage of VP4 does not affect binding of the virus to the cell surface, but it is required for entry of the virus into the cell's cytoplasm, and probably for the uncoating of the virus particle. The mechanism through which the trypsin cleavage of VP4 enhances rotavirus infectivity is not known, although it has been suggested that

it primes the virus for entry by triggering a conformational change in the protein that rigidifies the VP4 spikes (see later) [25]. An alternative explanation is that peptides generated by the trypsin cleavage of VP4 activate the membrane-destabilizing properties of the viral outer capsid proteins [26–29].

Rotavirus cell entry

Rotavirus entry into polarized cells

Despite the fact that *in vivo* rotaviruses infect mature enterocytes, studies on the infection of these type of cells have been limited by the lack of established cell lines of small intestinal origin. The few reports of enterocyte infection have been carried out in cultures of jejunal mucosal explants of ponies, primary murine small intestinal epithelial cells and bovine fetal intestinal epithelial cells, all of which were shown to be susceptible to infection by homologous and heterologous rotavirus strains [30–32]. Cell entry by rotavirus has also been studied in polarized cell lines grown on permeable membrane filters, where it was found that NA-resistant rotavirus strains infected the apical and basolateral sides of the cells with similar efficiency, while the infection of NA-sensitive strains was restricted to the apical side, and this selective infection correlated with the expression of SA on the apical membranes of the cells [33].

As already mentioned, integrins play an important role as receptors for rotavirus infection [5]. However, in polarized epithelia integrins are localized at the basolateral side of cells [34,35], where they would not be accessible for interaction with the virus. It was recently reported that the VP8 domain of VP4 specifically and transiently opens up tight junctions (TJs) in polarized MDCK cell monolayers [36], augmenting the paracellular passage of nonionic tracers, and allowing the diffusion of the basolateral proteins Na⁺/K⁺-ATPase, α v β 3 integrin and β 1 integrin subunit, to the apical side of the cells. These changes correlated with an altered subcellular distribution of the TJ proteins ZO-1, claudin-3 and occludin, suggesting that the interaction of the virus with polarized epithelia could also alter the TJs, allowing the basolateral integrins to diffuse to the apical domain of the cells, where they could interact with the viral particles.

Rotavirus entry into nonpolarized cells

Given the lack of a better model, most of the studies on the entry and replication cycle of rotavirus have been carried out either in the epithelial

monkey kidney cell line MA104 or in the human colon carcinoma cell line Caco-2, in which rotaviruses grow to high titers.

Early electron microscopy studies of rotavirus-infected cells described the presence of rotavirus particles in coated pits and in a variety of vesicles [37,38]. Using this technique, it was proposed that trypsin treated, infectious rotavirus particles enter cells by direct plasma membrane penetration, while the untreated, noninfectious viral particles are removed from the cell surface by endocytosis, a process that did not lead to a productive infection [39]. However, since electron microscopy studies are carried out with high multiplicities of infection, and virus preparations usually contain an excess of noninfectious particles, it is not possible to determine by this method alone whether individual events are part of a pathway leading to a productive infection.

The rate of cell entry by trypsin treated and nontreated simian rotavirus RRV was studied using an infection assay [40]; trypsin-activated virus was found to be internalized with a half-time of 3–5 min, while it took ten-times longer for the nonactivated virus to disappear from the cell surface. These results reinforce the idea that infectious rotavirus particles enter MA104 cells by direct membrane penetration, while noninfectious particles are internalized via a pathway that leads to a nonproductive infection. The direct penetration hypothesis was also supported by the fact that treatments known to affect the classical endocytic pathway did not seem to affect the infectivity of several different rotavirus strains (summarized in Table 2) [37,40–44]. Direct cell membrane penetration has also been proposed as a mechanism of entry of rotaviruses supported by the findings that purified trypsin-activated RRV

Table 2. Treatments that affect different steps in the cellular entry of rotaviruses.

Pathway affected	Inhibitors	Viral strain*	Cell line	Effect on infectivity	Ref.
Clathrin-mediated endocytosis	Chlorpromazine Sucrose Eps15 DN [†]	RRV	MA104	None	[47]
Caveolae-mediated endocytosis	Nystatin, Filipin	RRV	MA104	None	[47,99]
	M β -cyclodextrin	RRV, Wa, nar	MA104	90% reduction	
	Caveolin-1 DN	RRV	MA104	None	
	Caveolin-3 DN	RRV			
Vesicle scission	Dynamin DN	RRV	MA104	85% reduction	[47]
Cytoskeleton polymerization	Cytochalasin D	RRV	MA104	None	[47]
			L929	Sixfold increase	[41]
	Colchicine	RRV	MA104 L929	None	
Energy inhibitors	Sodium azide	RRV	MA104	None	[40,41]
			L929	None	
	Dinitrophenol	RRV	MA104	None	
Inhibitors of endosomal acidification	NH ₄ Cl	OSU, RRV, SA11, KUN	MA104	None	[37,40,41,43,47,84]
			L929	None [§]	[42,44,47]
	Bafilomycin A1	RRV, OSU, OSU, SA11	MA104	60% reduction [§]	[83]
			MA104	None	[37,40,41,43]
	Cloroquine	OSU, RRV, KUN, SA11	MA104	None	[41,84]
			L929	None	[42,43,47]
		Methylamine	RRV, KUN	MA104	None
	Dansylcadaverine	RRV, KUN	MA104	None	[84]
	Monensin	SA11	MA104		
	Nigericin	SA11	MA104		
Increase in [Ca ²⁺] _i	Ionophore A23187	OSU	MA104	Inhibition [¶]	[37]
	Ionomycin	RRV	MA104	None [§]	[42]
	Thapsigargin	RRV	MA104	None [§]	[83]
	Ca-EGTA	OSU, SA11	MA104	40–50% reduction [§]	

*RRV and SA11 (simian origin); nar (neuraminidase-resistant mutant of RRV strain); WA and KUN (human origin); OSU (porcine origin).

[†]Dominant-negative mutant.

[§]As measured by α -sarcin co-entry.

[¶]Inhibition of decapsidation.

virions mediated ^{51}Cr ium, ^{14}C holine and ^3H inositol release from prelabeled MA104 cells [40]. In addition, infectious rotavirus particles of bovine strain RF were found to permeabilize carboxyfluorescein preloaded vesicles [45], and purified VP5 protein was found to be responsible for this release [27]. However, in these experiments a vast excess of purified rotavirus particles were used in relation to lipid or membrane proteins, and therefore it is difficult to assess the biological significance of these observations given that, *in vivo*, the number of infectious units of rotavirus capable of establishing a productive infection is low [46]. Early membrane permeabilization was also observed during cell entry of RRV, OSU and RF strains, which allowed the co-entry of toxin α -sarcin, with maximum permeability observed with as little as ten infectious particles per cell [42,44].

More recently, the entry of rotaviruses in MA104 cells was re-evaluated using new molecular and biochemical tools (Table 2). Rotaviruses were shown to enter cells in the presence of compounds that inhibit clathrin-mediated endocytosis, as well as cells overexpressing a dominant-negative form of Eps15, a protein crucial for the assembly of clathrin coats. It was also found that treatment of cells with the cholesterol-binding agents nystatin and filipin, as well as the expression of dominant-negative caveolin-1 and -3 mutants, had no effect on rotavirus infection, suggesting that the virus was able to enter cells in which the caveolae uptake was blocked. Interestingly, cells expressing a dominant-negative mutant of the large GTPase dynamin, which is known to function in several membrane scission events, and cells treated with methyl- β -cyclodextrin, a drug that sequesters cholesterol from membranes, were poorly infected by rotavirus, indicating that cholesterol and dynamin play a role in the entry of these viruses [47]. Cholesterol is a key molecule involved in the integrity of membrane lipid microdomains known as 'lipid rafts' [48]. These structures have been shown to exist in cell membranes as a result of the differential affinity associations of lipids [49,50]. They are resistant to solubilization with mild detergents, and thus can be isolated as detergent-resistant membrane fractions by density centrifugation [51]. It was found that both the receptors for rotavirus and the infectious viral particle associate with detergent-resistant membrane early in infection [52], suggesting that lipid rafts play an important role during rotavirus cell entry, presumably by providing a platform that facilitates

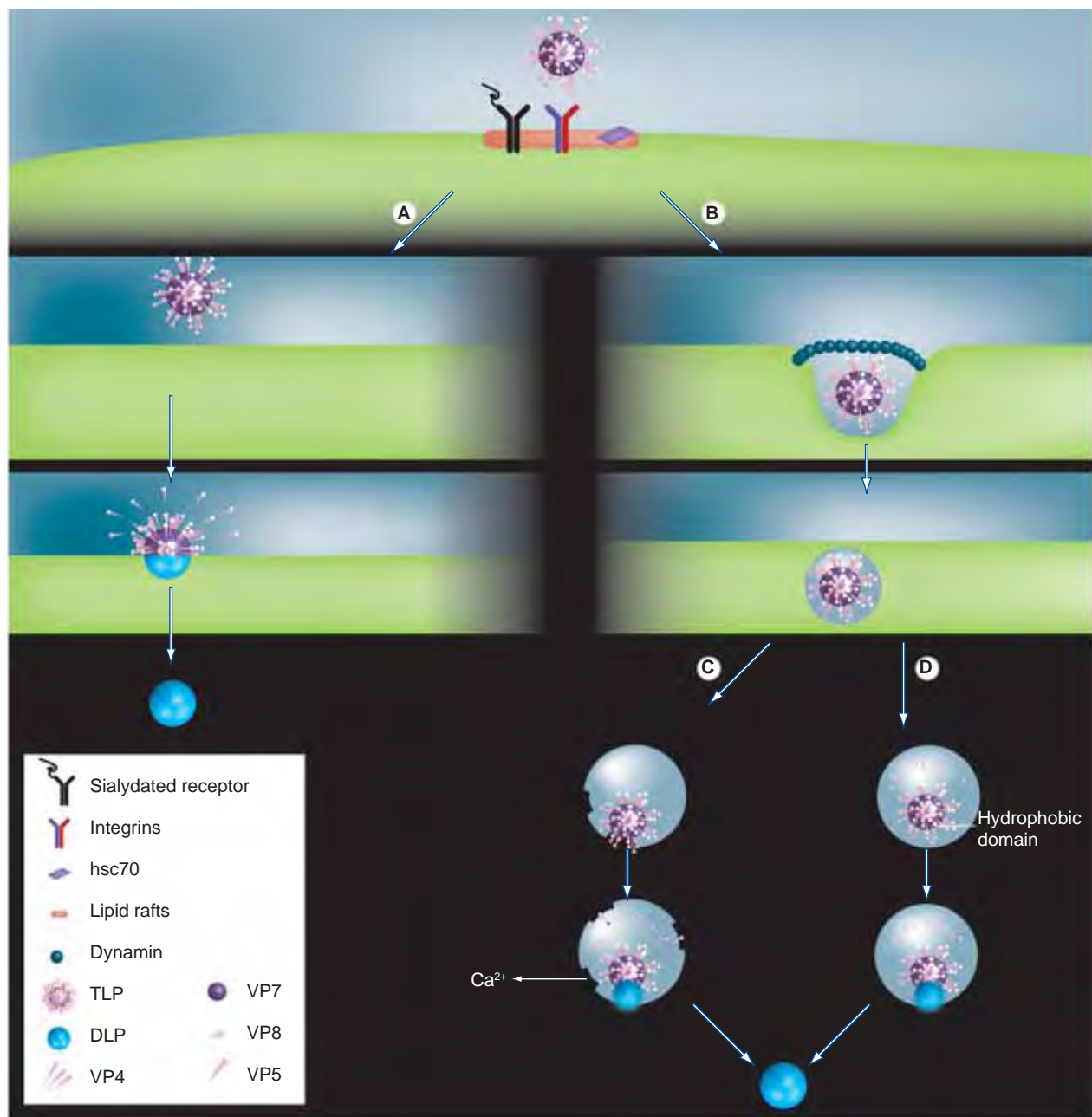
the efficient interaction of the cellular receptors with the viral particles. Interestingly, lipid rafts have also been found to be important during the morphogenetic process of rotaviruses [53–56]. Taken together, these results suggest that the entry of rotavirus RRV might use a recently described cell internalization pathway, referred to as caveolae/raft-dependent endocytosis, which is defined by its clathrin independence, dependence on dynamin and sensitivity to cholesterol depletion [57,58]. However, it can not be discarded that rotaviruses could enter the cell at the plasma membrane level, using an undefined, direct entry mechanism in which the depletion of cholesterol could either alter the fluidity of the membrane or disrupt the organization of the lipid rafts that might be holding together the rotavirus receptors, thus impairing virus entry (Figure 2).

Conformational changes

The initial binding of a virus to the cell is followed by a series of events that include changes to the structure of the virion. It has been shown that enveloped viruses frequently undergo conformational changes in their fusion glycoproteins following protease cleavage, and a secondary event that can include binding to a receptor and/or a pH change. These conformational changes are important in mediating the fusion of viral and cell membranes. Nonenveloped viruses, such as poliovirus, reovirus, or adenovirus have also been shown to undergo conformational changes upon interaction with their cell receptors [59–63]. In rotaviruses, it has been demonstrated that virus particles activated with trypsin become more hydrophobic [45]. It is possible that trypsin cleavage reorganizes the VP4 spikes into a conformation that will allow subsequent virus-receptor interactions; this hypothesis is based on recent studies demonstrating that, while the VP4 spikes of nontrypsinized particles of the Simian rotavirus strain SA11 4F could not be visualized by cryoelectron microscopy, these spikes became visible upon treatment of the virions with trypsin, indicating that the cleavage of VP4 yields icosahedrally ordered spikes, which are structurally different in trypsin cleaved and uncleaved virions [25].

As previously mentioned, during entry rotaviruses interact with several cell-surface molecules, including SA, gangliosides, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ and $\alpha v\beta 3$, and hsc70 [5,7]. Some of these receptors are used for virus attachment, while others appear to be involved in postattachment steps, and it has been proposed

Figure 2. Possible modes of rotavirus entry.



The interaction of rotavirus with its receptors induces conformational changes that allow the entry of the virus into the cell. The precise mechanism used by rotaviruses to enter the cell is not completely understood; however, recent findings point at two entry pathways. The first involves the direct penetration of rotavirus into the cell, resulting in the release of the DLP into the cytoplasm (A). The other possible route involves dynamin-dependent endocytosis, where the TLP particle is internalized in an endocytic vesicle (B). Once in this cellular compartment, distinct mechanisms may be involved to trigger the membrane penetration process. (C) A calcium-dependent mechanism, in which the virus uses an endocytic pathway that is sensitive to Ca^{2+} concentration [76]. In this model, the virus enters the cell by endocytosis and the vacuolar proton ATPase pump could provide the force for Ca^{2+} extrusion of the vesicle, lowering its concentration and favoring the solubilization of the viral outer capsid proteins, which in turn could permeabilize the endosomal membrane [75,76]. Once in the endocytic vesicle, the VP8 protein dissociates from the particle, exposing a hydrophobic domain on VP5, which could insert itself into the endocytic membrane, creating pores that could allow the viral particles to exit this vesicle (D).
 DLP: Double-layered particle; hsc: Heat shock cognate protein; TLP: Triple-layered particle; VP: Viral protein.

that these sequential interactions might cause conformational changes in the viral particle that could eventually lead to the virus penetrating the membrane and uncoating, similar to what occurs in adenovirus [61], or several members of the *Picornaviridae* family [64–66]. The evidence that supports the conformational changes of rotavirus proteins during virus entry are derived from several different observations. A single aa substitution in the SA-binding domain of VP8 causes a conformational change in the protein [67,68] that allows RRV and OSU mutant strains to directly interact with integrin $\alpha 2\beta 1$, surpassing the initial interaction with SA [69].

The determination of the crystal structure of a large fragment of VP5 revealed further possible conformational changes during rotavirus cell entry [12,70]. It was found that this part of the protein folds back on itself, changing its structure from a dimer to a trimer, resulting in the translocation of a potential membrane-interacting peptide from one end of the spike to the other. Based on these observations it was proposed that the structural changes in VP5 might lead to the release of VP8 from the viral particle, unmasking a hydrophobic VP5 domain, which could insert into the membrane, a process that resembles the conformational changes observed in the membrane fusion proteins of some enveloped viruses [71,72]. The interaction(s), or condition(s), that could trigger this conformational change in VP5 are not yet clear. Furthermore, one of the molecules involved in the postbinding steps of rotavirus cell entry is hsc70 [73]; this chaperone protein has been associated with the transport of proteins across cell membranes, binding to nascent polypeptides, with the dissociation of clathrin from clathrin coats [74]. The interaction of hsc70 with rotavirus RRV in solution resulted in subtle conformational changes on the viral outer capsid proteins, which resulted in a partial loss of infectivity, leaving open the possibility that interaction of the virus with the membrane-associated hsc70 might induce conformational changes in the viral proteins that favor virus entry [75], in a manner similar to other viruses [76–79].

Virus uncoating

During, or shortly after, cell entry, the infecting TLP uncoats, losing the two outer layer proteins to yield a DLP that is transcriptionally active. The transcriptase activity is observed in *in vitro* assays when the surface proteins VP4 and VP7 are removed from mature TLPs by treatment

with Ca^{2+} -chelating agents [80]. *In vivo* it is not clear whether the virus uncoats during the penetration step or once it has reached the cytoplasmic milieu. It has been suggested that the penetration of the virions into the cell's cytoplasm, which has a Ca^{2+} concentration several orders of magnitude lower than the extracellular media, might be the factor that triggers the uncoating of the virus and the activation of the viral transcriptase. The observation that increases in cytoplasmic Ca^{2+} concentration induced by ionophores inhibit the uncoating of the porcine strain OSU supports this hypothesis [37], however, similar treatments did not inhibit the infectivity of simian strain RRV (Table 2) [42]. One possible explanation for these discrepancies is that different rotavirus strains require different Ca^{2+} concentrations to maintain the stability of the outer surface proteins on the viral particle [81,82].

The inhibition of infectivity of rotavirus OSU after treatment with bafilomycin A1 (an inhibitor of the endosomal H^+ -ATPase), together with the ability of soluble outer capsid protein to permeabilize cell membranes (see above), led to the hypothesis that rotaviruses use an endocytic pathway that is sensitive to Ca^{2+} concentration [83]. In this model, it was proposed that the trypsin-activated virus enters the cell by clathrin-mediated endocytosis and, once in the endosome, the vacuolar proton ATPase pump could provide the force for Ca^{2+} extrusion of the endosome, lowering its concentration and favoring the solubilization of the viral outer capsid proteins, which in turn could permeabilize the endosomal membrane, releasing the DLP into the cytoplasm [26,83]. Even though this model seems plausible, some conflicting results need to be taken into account; as mentioned earlier, treatments which affect clathrin-mediated endocytosis have not been found to affect rotavirus cell entry [37,40,42,44,47,84] and, although bafilomycin A1 is considered to be a specific inhibitor of the vacuolar proton ATPase, it has recently been reported that it can also affect other cell functions, such as endocytic transport, trapping virtually all viruses in early endosomes [85,86]. Thus, the precise mechanism that triggers rotavirus uncoating remains to be clarified.

Conclusion

Rotavirus entry seems to require sequential interactions of the virus surface proteins with distinct cell-surface molecules, in an organized membrane microenvironment (rafts).

The mechanism of virus entry into the natural target cells (enterocytes) is still not known and, to date, the available information comes from studies on different cell lines. The proposed mechanisms for the entry of rotavirus into cells have changed with time, going from classical endocytosis, to direct membrane penetration, and finally to a poorly characterized type of endocytosis. It is important to point out that the rotavirus strains that have been used in these studies are generally isolates adapted to grow in cell culture, and their mode of entry may differ from wild-type viruses when infecting enterocytes. The differences in receptor usage reported for different rotavirus strains suggest that there could also be differences in the mechanisms of cell entry used by different isolates.

In summary, the cell entry of the best studied rotavirus strain, RRV, suggests that after the initial interaction with SA, the virus interacts with several other cell-surface receptors located in lipid rafts, which promotes some conformational changes in the surface proteins of the virus that leads to penetration of the viral protein into the cytoplasm. The entry of RRV might use a recently described cell internalization pathway

referred to as caveolae/raft-dependent endocytosis, which is defined by its clathrin independence, dependence on dynamin and sensitivity to cholesterol depletion [48]. It is not known how or when the outer capsid is lost, nor how the virus is released from the endosome, but conformational changes of the virus surface proteins and the low concentration of intracellular Ca^{2+} could be involved in this process.

Future perspective

During the last decade a number of rotavirus receptors have been identified, and the mechanism of cell entry for some rotavirus strains has been partially characterized. An approach that should improve our knowledge about this process, which is just starting to be considered, is the study of the signaling cascades triggered during rotavirus cell entry. A powerful technique that will be used for this purpose is the silencing of the expression of selected genes by RNA interference. This technology will also be used in the near future to identify the cellular proteins that are involved in rotavirus entry, as well as those involved in later steps of virus replication, through genome-wide screenings using siRNA

Executive summary

Rotavirus cell entry

- Rotaviruses, the most important cause of severe diarrhea in children, infect the mature enterocytes of the small intestine.
- Owing to the lack of enterocyte cell lines, most studies of rotavirus cell entry have been carried out in epithelial cell lines (MA104 and Caco-2 cells) where the virus replicates efficiently, although they are not natural targets of the virus.
- Even though huge progress in the characterization of rotavirus receptors has been made, the mechanism by which these viruses enter their host cell has not been completely elucidated, and most of the studies have ended up with negative results, providing evidence about how these viruses do not enter the cell.
- The entry of these viruses does not occur through clathrin- or caveolae-mediated endocytosis, and they depend neither on the acidification of endosomes, nor on cytoskeleton proteins.
- Rotaviruses require cleavage by trypsin to be infectious, and depend on the presence of cholesterol on the cell membrane and the activity of the large GTPase dynamin.

Conclusion

- Considering the cell entry of the best studied rotavirus strain, RRV, it seems that after the initial interaction of the virus particle with sialic acids, it interacts with several other receptors organized in lipid rafts in the cell membrane. During these interactions some conformational changes in the viral particle take place, which are then followed by a recently described cell internalization pathway, referred to as caveolae/raft-dependent endocytosis, defined by its clathrin independence, dependence on dynamin, and sensitivity to cholesterol depletion.
- It is not yet known how the outer capsid is lost and how the virus is released from the endosome, but conformational changes and low intracellular Ca^{2+} levels could be involved.

Future perspective

- The study of virus entry into mature enterocytes, the primary natural target cells, must be carried out.
- The recently available imaging and functional genomic tools will be of great help to define more clearly the cell entry of rotaviruses; the use of time-lapse imaging and single-particle tracking of fluorescently-labeled rotavirus particles in living cells, and the genome-wide screening of siRNA and microRNA libraries to silence most of the genes involved in rotavirus infection will provide insight into the mechanism of entry of these viruses.

or microRNA libraries designed to silence most cellular genes. RNA interference was recently used to identify the cellular kinases that are important in clathrin- and caveolae-dependent endocytosis [87].

Since most of the current knowledge on rotavirus cell entry has been obtained using model cell lines, it is important that future studies make a special effort to characterize rotavirus entry into mature enterocytes, the natural targets of the virus. In addition, new methods that are developing at great speed, such as time-lapse imaging and single-particle tracking in living cells (reviewed in [88]), which were recently used to analyze the cell entry of poliovirus and dengue virus [89,90], would be important to incorporate in future studies to follow the entry of infectious virus particles into cells. The use of these techniques will allow us to observe the cell entry of fluorescently-labeled single virus particles in real

time and their interactions with cellular proteins during this process. The knowledge generated by these new approaches should provide information that is relevant for the design of novel therapeutic measures against infection with these viruses.

Financial & competing interests disclosure

Work on rotavirus cell entry in our laboratories is supported by grants 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, 60025 from CONACyT and IN210807 from DGAPA/UNAM. MG is a recipient of a scholarship from the National Council for Science and Technology (Mexico). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 565–572 (2003).
- From the Centers for Disease Control and Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine – United States, 1998–1999. *JAMA* 282, 520–521 (1999).
- Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS *et al.*: Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 344, 564–572 (2001).
- Estes MK, Kapikian AZ: Rotaviruses. In: *Fields Virology*. Knipe NM, Howley PM (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, USA, 1917–1974 (2007).
- Lopez S, Arias CF: Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12, 271–278 (2004).
- **Describes the sequential interactions between rotaviruses and their cell membrane receptors.**
- Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S: Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70, 5832–5839 (1996).
- **Detailed analysis of the rotavirus–trypsin-activation pathway, describing the sequentiality of viral protein (VP)4 processing, and its correlation with the enhancement of viral infectivity.**
- Lopez S, Arias CF: Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 39–66 (2006).
- Isa P, Arias CF, Lopez S: Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27–37 (2006).
- Ciarlet M, Estes MK: Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80, 943–948 (1999).
- Ciarlet M, Ludert JE, Iturriza-Gomara M *et al.*: Initial interaction of rotavirus strains with *N*-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J. Virol.* 76, 4087–4095 (2002).
- Graham KL, Halasz P, Tan Y *et al.*: Integrin-using rotaviruses bind $\alpha 2\beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha \beta 2$ and $\alpha \beta 3$ by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77, 9969–9978 (2003).
- Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC: Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430, 1053–1058 (2004).
- **Determination of crystal structure of the main body of the VP4 spike, revealing a coil–coil stabilized trimer, and describing the possible reorganization of VP5 from dimer to trimer.**
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X: Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 567–573 (2004).
- Sun X, Yau VK, Briggs BJ, Whittaker GR: Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338, 53–60 (2005).
- Chu JJ, Ng ML: Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* 78, 10543–10555 (2004).
- Skehel JJ, Wiley DC: Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569 (2000).
- Sieczkarski SB, Whittaker GR: Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* 4, 333–343 (2003).
- Gibbons DL, Vaney MC, Roussel A *et al.*: Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* 427, 320–325 (2004).
- Mayor S, Pagano RE: Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612 (2007).
- **Reviews the recently described endocytosis pathways.**
- Sieczkarski SB, Whittaker GR: Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83, 1535–1545 (2002).
- Barnett BB, Spendlove RS, Clark ML: Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* 10, 111–113 (1979).

22. Espejo RT, Lopez S, Arias C: Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156–160 (1981).
23. Estes MK, Graham DY, Mason BB: Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39, 879–888 (1981).
24. Theil KW, Bohl EH, Agnes AG: Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). *Am. J. Vet. Res.* 38, 1765–1768 (1977).
25. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK *et al.*: Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J. Virol.* 75, 6052–6061 (2001).
- **Describes the differential conformations of VP4 spikes depending on trypsin processing; the spikes become rigid and visible by cryoelectron microscopy only after trypsin treatment of the virus.**
26. Ruiz MC, Abad MJ, Charpilienne A, Cohen J, Michelangeli F: Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J. Gen. Virol.* 78, 2883–2893 (1997).
27. Ruiz MC, Alonso TS, Charpilienne A *et al.*: Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J. Virol.* 68, 4009–4016 (1994).
28. Denisova E, Dowling W, LaMonica R *et al.*: Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes. *J. Virol.* 73, 3147–3153 (1999).
29. Charpilienne A, Abad MJ, Michelangeli F *et al.*: Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J. Gen. Virol.* 78, 1367–1371 (1997).
30. Buckner D, Wilson S, Kurk S, Hardy M, Miessner N, Jutila MA: Use of early passage fetal intestinal epithelial cells in semi-high-throughput screening assays: an approach to identify new innate immune system adjuvants. *J. Biomol. Screen.* 11, 664–671 (2006).
31. Batt RM, Embaye H, van de Waal S, Burgess D, Edwards GB, Hart CA: Application of organ culture of small intestine to the investigation of enterocyte damage by equine rotavirus. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20, 326–332 (1995).
32. Macartney KK, Baumgart DC, Carding SR, Brubaker JO, Offit PA: Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. *J. Virol.* 74, 5597–5603 (2000).
33. Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK: Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J. Virol.* 75, 11834–11850 (2001).
- **Describes differential infection of polarized cells depending on neuraminidase sensitivity of rotavirus strains.**
34. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25 (1992).
35. Gut A, Balda MS, Matter K: The cytoplasmic domains of a $\beta 1$ integrin mediate polarization in Madin–Darby canine kidney cells by selective basolateral stabilization. *J. Biol. Chem.* 273, 29381–29388 (1998).
36. Nava P, Lopez S, Arias CF, Islas S, Gonzalez-Mariscal L: The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 5509–5519 (2004).
- **Describes the capacity of rotavirus VP8 protein to open tight junctions in polarized epithelial cells, and its implications for rotavirus cell entry.**
37. Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J: Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 27, 95–101 (1987).
38. Quan CM, Doane FW: Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology* 20, 223–231 (1983).
39. Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, Ishida N: Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch. Virol.* 85, 25–34 (1985).
40. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB: Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62, 1136–1144 (1988).
41. Bass DM, Baylor M, Chen C, Upadhyayula U: Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology* 212, 429–437 (1995).
42. Cuadras MA, Arias CF, Lopez S: Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* 71, 9065–9074 (1997).
43. Fukuhara N, Yoshie O, Kitaoka S, Konno T, Ishida N: Evidence for endocytosis-independent infection by human rotavirus. *Arch. Virol.* 97, 93–99 (1987).
44. Liprandi F, Moros Z, Gerder M *et al.*: Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor α -sarcin. *Virology* 237, 430–438 (1997).
45. Nandi P, Charpilienne A, Cohen J: Interaction of rotavirus particles with liposomes. *J. Virol.* 66, 3363–3367 (1992).
46. Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM: Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.* 154, 871–880 (1986).
47. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S: Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78, 2310–2318 (2004).
- **Detailed analysis of cell entry by Simian rotavirus RRV by using different inhibitors and treatments, and expression of dominant-negative mutants important for different endocytic pathways.**
48. Simons K, Vaz WL: Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269–295 (2004).
49. Brown DA, Rose JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533–544 (1992).
50. Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK: Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148, 997–1008 (2000).
51. Manes S, del Real G, Martinez AC: Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 557–568 (2003).
52. Isa P, Realpe M, Romero P, Lopez S, Arias CF: Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 322, 370–381 (2004).
53. Broquet AH, Lenoir C, Gardet A *et al.*: Hsp70 negatively controls rotavirus protein bioavailability in Caco-2 cells infected by the rotavirus RF strain. *J. Virol.* 81, 1297–1304 (2007).
54. Cuadras MA, Greenberg HB: Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 313, 308–321 (2003).
55. Delmas O, Breton M, Sapin C, Le Bivic A, Colard O, Trugnan G: Heterogeneity of raft-type membrane microdomains associated with VP4, the rotavirus spike protein, in Caco-2 and MA 104 cells. *J. Virol.* 81, 1610–1618 (2007).

56. Delmas O, Durand-Schneider AM, Cohen J, Colard O, Trugnan G: Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized Caco-2 cells. *J. Virol.* 78, 10987–10994 (2004).
57. Nabi IR, Le PU: Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 161, 673–677 (2003).
58. Lajoie P, Nabi IR: Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell Mol. Med.* 11, 644–653 (2007).
59. Cavalli A, Prota AE, Stehle T *et al.*: A molecular dynamics study of reovirus attachment protein $\sigma 1$ reveals conformational changes in $\sigma 1$ structure. *Biophys J.* 86, 3423–3431 (2004).
60. Fernandes J, Tang D, Leone G, Lee PW: Binding of reovirus to receptor leads to conformational changes in viral capsid proteins that are reversible upon virus detachment. *J. Biol. Chem.* 269, 17043–17047 (1994).
61. Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF: The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J. Virol.* 74, 7085–7095 (2000).
62. Tosteson MT, Wang H, Naumov A, Chow M: Poliovirus binding to its receptor in lipid bilayers results in particle-specific, temperature-sensitive channels. *J. Gen. Virol.* 85, 1581–1589 (2004).
63. Tuthill TJ, Bubeck D, Rowlands DJ, Hogle JM: Characterization of early steps in the poliovirus infection process: receptor-decorated liposomes induce conversion of the virus to membrane-anchored entry-intermediate particles. *J. Virol.* 80, 172–180 (2006).
64. Hewat EA, Blaas D: Cryoelectron microscopy analysis of the structural changes associated with human rhinovirus type 14 uncoating. *J. Virol.* 78, 2935–2942 (2004).
65. Silberstein E, Xing L, van de Beek W, Lu J, Cheng H, Kaplan GG: Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin- and mucin-like regions. *J. Virol.* 77, 8765–8774 (2003).
66. Hogle JM: Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 677–702 (2002).
67. Mendez E, Arias CF, Lopez S: Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67, 5253–5259 (1993).
68. Ludert JE, Mason BB, Angel J *et al.*: Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 4), 725–729 (1998).
69. Zarate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, Lopez S: Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278, 50–54 (2000).
70. Yoder JD, Dormitzer PR: Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement. *EMBO J.* 25, 1559–1568 (2006).
- **Description of alternative, well-ordered dimers and trimers of VP5 protein, which facilitate the VP5 reorganization, thought to mediate membrane penetration during cell entry.**
71. Ruigrok RW, Aitken A, Calder LJ *et al.*: Studies on the structure of the influenza virus haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 69, 2785–2795 (1988).
72. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC: Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319 (2004).
73. Guerrero CA, Bouyssonade D, Zarate S *et al.*: Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76, 4096–4102 (2002).
74. Bukau B, Horwich AL: The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351–366 (1998).
75. Perez-Vargas J, Romero P, Lopez S, Arias CF: The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J. Virol.* 80, 3322–3331 (2006).
76. Jones PL, Korte T, Blumenthal R: Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 404–409 (1998).
77. Gilbert JM, Hernandez LD, Balliet JW, Bates P, White JM: Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 69, 7410–7415 (1995).
78. Belnap DM, Filman DJ, Trus BL *et al.*: Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J. Virol.* 74, 1342–1354 (2000).
79. Ivanovic T, Agosto MA, Chandran K, Nibert ML: A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly. *J. Biol. Chem.* 282, 12210–12219 (2007).
80. Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R: Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60, 177–182 (1979).
81. Gajardo R, Vende P, Poncet D, Cohen J: Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J. Virol.* 71, 2211–2216 (1997).
82. Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J: The concentration of Ca^{2+} that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J. Virol.* 70, 4877–4883 (1996).
83. Chemello ME, Aristimuno OC, Michelangeli F, Ruiz MC: Requirement for vacuolar H^{+} -ATPase activity and Ca^{2+} gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J. Virol.* 76, 13083–13087 (2002).
84. Keljo DJ, Kuhn M, Smith A: Acidification of endosomes is not important for the entry of rotavirus into the cell. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 257–263 (1988).
85. Drose S, Altendorf K: Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* 200, 1–8 (1997).
86. Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R: Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J. Virol.* 72, 9645–9655 (1998).
87. Pelkmans L, Fava E, Grabner H *et al.*: Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436, 78–86 (2005).
88. Brandenburg B, Zhuang X: Virus trafficking – learning from single-virus tracking. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 197–208 (2007).
- **Excellent review that points out the methodological possibilities that offer single virus particle tracking in living cells.**
89. Brandenburg B, Lee LY, Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, Hogle JM: Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol.* 5, e183 (2007).
90. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL *et al.*: Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J. Virol.* 81, 12019–12028 (2007).

91. Bass DM, Mackow ER, Greenberg HB: Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology* 183, 602–610 (1991).
92. Delorme C, Brussow H, Sidoti J *et al.*: Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol.* 75, 2276–2287 (2001).
93. Guo C, Nakagomi O, Mochizuki M *et al.*: Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem.* 126, 683–688 (1999).
94. Rolsma MD, Gelberg HB, Kuhlenschmidt MS: Assay for evaluation of rotavirus-cell interactions: identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates group A porcine rotavirus recognition. *J. Virol.* 68, 258–268 (1994).
95. Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E *et al.*: VLA-2 ($\alpha 2\beta 1$) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J. Virol.* 76, 1109–1123 (2002).
96. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ: Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 5389–5394 (1997).
97. Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF: Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 14644–14649 (2000).
98. Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R *et al.*: Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* 77, 7254–7260 (2003).
99. Guerrero CA, Zarate S, Corkidi G, Lopez S, Arias CF: Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74, 9362–9371 (2000).

Affiliations

- *Pavel Isa*
UNAM, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Tel.: +52 777 329 1612;
Fax: +52 777 317 2388;
pavel@ibt.unam.mx

- *Michelle Gutiérrez*
UNAM, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1612;
Fax: +52 777 317 2388;
mayret@ibt.unam.mx

- *Carlos F Arias*
UNAM, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1671;
Fax: +52 777 317 2399;
arias@ibt.unam.mx

- *Susana López*
UNAM, Instituto de Biotecnología, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1615;
Fax: +52 777 317 2388;
susana@ibt.unam.mx

Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis[∇]

Michelle Gutiérrez, Pavel Isa, Claudia Sánchez-San Martín, Jimena Pérez-Vargas, Rafaela Espinosa, Carlos F. Arias, and Susana López*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210, México

Received 6 April 2010/Accepted 2 July 2010

Rotaviruses, the single most important agents of acute severe gastroenteritis in children, are nonenveloped viruses formed by a three-layered capsid that encloses a genome formed by 11 segments of double-stranded RNA. The mechanism of entry of these viruses into the host cell is not well understood. The best-studied strain, RRV, which is sensitive to neuraminidase (NA) treatment of the cells, uses integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 3$ and the heat shock protein hsc70 as receptors and enters MA104 cells through a non-clathrin-, non-caveolin-mediated pathway that depends on a functional dynamin and on the presence of cholesterol on the cell surface. In this work, using a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches, we compared the entry characteristics of four rotavirus strains known to have different receptor requirements. We chose four rotavirus strains that represent all phenotypic combinations of NA resistance or sensitivity and integrin dependence or independence. We found that even though all the strains share their requirements for hsc70, dynamin, and cholesterol, three of them differ from the simian strain RRV in the endocytic pathway used. The human strain Wa, porcine strain TFR-41, and bovine strain UK seem to enter the cell through clathrin-mediated endocytosis, since treatments that inhibit this pathway block their infectivity; consistent with this entry route, these strains were sensitive to changes in the endosomal pH. The inhibition of other endocytic mechanisms, such as macropinocytosis or caveola-mediated uptake, had no effect on the internalization of the rotavirus strains tested here.

Endocytosis is a cellular process that involves the formation of a vesicle whose cargo is transported from the extracellular milieu to the interior of the cell. Several endocytic pathways have been described, and all of them have been shown to be used by viruses during cell entry. These pathways include clathrin-mediated endocytosis, uptake via caveolae, macropinocytosis, phagocytosis, and a novel non-clathrin-, non-caveola-mediated pathway that is currently not well characterized (32). While detailed information about the entry of several enveloped viruses is now available (4, 35, 49, 53, 56), the mechanism by which nonenveloped viruses enter cells is not well understood. Two general mechanisms have been proposed to be used by these viruses to reach the cell's cytoplasm: direct penetration at the cell surface, during which the viral particles are directly translocated from the external milieu into the cytoplasm, or internalization through endocytic processes (55).

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are the leading etiologic agent of viral gastroenteritis in infants and young children worldwide, being responsible for an estimated 500,000 deaths each year (41). These nonenveloped viruses are formed by three concentric layers of protein that surround the viral genome, formed by 11 segments of double-stranded RNA. The outermost layer of the virion is formed by two proteins, VP4 and VP7, which are involved in the early interactions of the

virus with its host cell (7, 27). VP4 is involved in receptor binding and cell penetration. The role of VP7 is less clear, although it has been shown that it interacts with the cell surface molecules at a postattachment step (17). After binding to the cell surface, the virus penetrates the plasma membrane to productively infect the cell. This penetration depends on the trypsin treatment of the virus, which results in the specific cleavage of VP4 to polypeptides VP8 and VP5. This cleavage promotes VP4 rearrangements in the viral particles that rigidify the spikes (7, 11).

Despite the fact that, *in vivo*, rotaviruses primarily infect the mature enterocytes of the small intestine, studies of the infection of this type of cells have been limited due to the lack of established intestinal cell lines of small intestine origin. Given the absence of a better model, most of the studies on the entry and replication cycle of rotavirus have been conducted either in the epithelial monkey kidney cell line MA104 or in the human colon carcinoma cell line Caco-2, which are highly permissive to these viruses.

Using as a model MA104 cells and the simian rotavirus RRV, we have proposed that rotavirus cell entry is a complex multistep process that involves the two virus surface proteins and several cell receptors, including sialic acids, gangliosides, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, and $\alpha \chi \beta 2$, and the heat shock cognate protein hsc70 (22). We have also shown that depletion of cholesterol from the cellular membrane severely impairs the infectivity of rotavirus (19, 50) and have suggested that sphingolipid- and cholesterol-enriched membrane lipid microdomains might be involved in rotavirus cell entry, since the virus and its receptors associate with these domains at early times

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone: (52) (777) 3291615. Fax: (52) (777) 3172388. E-mail: susana@ibt.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 14 July 2010.

TABLE 1. Cellular receptor requirements of different rotavirus strains

Strain	Origin	Neuraminidase sensitivity	Integrin dependent	References
RRV	Simian	Yes	Yes	5, 6, 17
TFR-41	Porcine	Yes	No	6, 17
UK	Bovine	No	No	6, 17
Wa	Human	No	Yes	5, 17, 34

during infection (23). However, there are some rotavirus strains that may not use all these molecules; some rotavirus strains are resistant to the neuraminidase (NA) treatment of the cell, and thus, they have been classified as NA resistant (6, 34). Additionally, the infectivity of some viral strains is not blocked by anti-integrin antibodies, suggesting the existence of rotavirus strains that are integrin independent (Table 1) (17).

The precise mechanism utilized by rotavirus to enter the cell is, however, not yet defined. Recently, we reported that the entry of the simian rotavirus strain RRV is independent of clathrin- and caveola-mediated endocytosis; however, it is dependent on dynamin (a protein involved in the scission of the endocytic vesicles from the cellular membrane) and requires the presence of cholesterol in the cell membrane (50). In this work, using a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches, we compared the entry characteristics of four rotavirus strains known to have different receptor requirements. We found that all the strains tested share the requirement for hsc70, cholesterol, and dynamin. Unexpectedly, we found that there were differences in the type of endocytic route utilized by three of the strains compared to that of simian strain RRV. Bovine strain UK, porcine strain TFR-41, and human strain Wa more likely enter the cell through a clathrin-dependent mechanism, since treatments that inhibit this process block the infectivity of these rotavirus strains; in contrast, the entry of RRV, as previously shown (50), is independent of this pathway. The inhibition of other endocytic mechanisms, such as macropinocytosis or caveola-mediated uptake, had no effect on the entry of the rotavirus strains tested here.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in Advanced DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS) and was used for all experiments carried out in this work. Rhesus rotavirus strain RRV and the human strain Wa were obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), bovine rotavirus UK was donated by D. R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, United Kingdom), and porcine strain TFR-41 was obtained from I. Holmes (University of Melbourne, Victoria, Australia). All rotavirus strains were grown in MA104 cells as described previously (40). Double-layered rotavirus particles (DLPs) from different strains were purified by CsCl density gradient as reported previously (14). Reovirus type 1 was kindly provided by C. Ramos (CISEI, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico). Simian virus 40 (SV40) was obtained from L. Gutiérrez (National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico).

Antibodies and reagents. Monoclonal antibodies (MAbs) to clathrin heavy chain, hsc70, and hsp70 were purchased from ABR Antibodies (Golden, CO). MAbs against the large antigen of SV40 (anti-SV40 TAg) and antihemagglutinin (anti-HA) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Tetramethylrhodamine-conjugated dextran (TMR-dextran) and Alexa 488- and 568-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal

antibody was from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). Rabbit polyclonal antibodies to purified rotavirus particles (anti-TLPs), to rotavirus nonstructural protein (anti-NSP2), to reovirus, and to vimentin were produced in our laboratory. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), sucrose, bafilomycin A1, DMA [5-(*N,N*-dimethyl)amlioride hydrochloride], and water-soluble cholesterol (BioReagent product no. C4951) were purchased from Sigma (St. Louis, MO); ammonium chloride was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ).

Infectivity assay. Confluent MA104 cells in 96-well plates (for rotavirus infection) or 24-well plates (for SV40 infection) were washed twice with Eagle's minimum essential medium (MEM), and then approximately 2,000 focus-forming units (FFU) of rotavirus or reovirus or 6,000 FFU of SV40 were adsorbed to cells for 60 min at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, MEM was added, and the infection was left to proceed for 15 h for reovirus and rotavirus strains or 18 h for SV40 at 37°C. Infected cells were detected by an immunoperoxidase FFU assay using a rabbit hyperimmune serum directed to triple-layered particles (TLPs) (for RRV, UK, and TFR-41), a hyperimmune serum to rotavirus Wa, or a rabbit antireovirus antibody, as described previously (8). Briefly, cell monolayers were fixed with 80% acetone in phosphate-buffered saline (PBS), and intracellular viral antigen was detected by antirotavirus or antireovirus polyclonal antibodies followed by a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody as described earlier (8). The FFUs were counted in a VisiLab 1000 station (Biocom, Les Ulises, France) as reported previously (19). SV40-infected cells were detected by a fluorescence focus assay using an anti-SV40 TAg MAb as described previously (52).

Kinetics of rotavirus cell entry. To measure the rate of rotavirus cell entry, confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with cold MEM and left to chill on ice. Then, approximately 2,000 FFUs of each rotavirus strain were added per well, and the viruses were allowed to bind on ice for 1 h. After this time, unbound viruses were washed, warmed MEM was added, and the plates were placed over a 37°C water bath. At the time points indicated (see Fig. 1), the medium in the wells was aspirated, and viral particles still present on the cell surface were detached by two quick washes with 3 mM EGTA in PBS, followed by incubation in warm MEM. After reaching the last time point of the entry measurements (90 min), the 96-well plates were placed into a CO₂ incubator, and the infection was left to proceed for an additional 15 h. The cells were then fixed and stained as described above. The amount of virus that entered at each time point was compared to the amount of virus that entered when no EGTA wash was performed, which was taken as 100% entry.

Treatment of MA104 cells with inhibitors. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM and were pretreated or not with different concentrations (indicated in each figure) of M β CD and bafilomycin A1 (for 1 h), NH₄Cl and DMA (for 30 min), or sucrose (for 10 min); all reagents were dissolved in MEM. After this incubation, cells were infected with the different rotavirus strains or with reovirus (2,000 FFU per well) for 1 h, with the different reagents (except M β CD) maintained during this period. Cells were washed twice with 3 mM EGTA in PBS to remove viral particles still present on the cell surface. Reovirus-infected cells were further incubated with an antireovirus polyclonal antibody for 15 min to neutralize the virus that remained on the cell surface. Then, the infection was left to proceed for an additional 15 h. For cholesterol replenishment assays, cells were washed twice with MEM and treated for 1 h with M β CD 10 mM. After this treatment, the cells were washed twice with MEM, and water-soluble cholesterol (100 μ g/ml) was added for 1 h. The cells were washed again and were infected with rotavirus strains for 1 h. Finally, the cells were washed and the infection was left to proceed for 15 h; all incubations were performed at 37°C. After incubation, cells were fixed, stained, and analyzed as described above. None of these treatments caused cell death as determined by morphological examination and trypan blue exclusion assays (results not shown).

Dextran uptake. Confluent monolayers of MA104 cells grown on coverslips in 48-well plates were washed twice with MEM and treated with DMA for 30 min. Then, the cells were cooled for 10 min at 4°C. After this period, the cells were incubated with TMR-dextran (100 μ M) in the presence of DMA for 30 min at 4°C. Prewarmed MEM was added, and the cells were shifted to 37°C for 45 min. Finally, dextran uptake was stopped by washing with cold MEM and the cells were fixed and prepared for immunofluorescence as described below.

Blocking of rotavirus infectivity with monoclonal antibodies to hsc70. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM, and different concentrations of MAbs to hsc70 (MA3-006) or to hsp70 (MA3-009) were added to cells for 90 min at 37°C (18). After this incubation period, MAbs were removed and cells were infected with the different rotavirus strains (2,000 FFU per well) for 1 h at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, cells were washed twice with MEM, and the

infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as mentioned above.

Plasmids and transfections. Plasmids pCDNA3.1/Dyn2 (for wild-type [wt] dynamin), which expresses N-terminally HA-epitope-tagged dynamin, and pCDNA3.1/K44A (for mutant dynamin), expressing an N-terminally HA-epitope-tagged K44A mutant, were kindly provided by S. L. Schmid (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). pCINeo/IRES-GFP/caveolin-1 and pCINeo/IRES-GFP/caveolin-1 DN, which are bicistronic expression vectors expressing green fluorescent protein (GFP) and wild-type caveolin-1 or a mutant caveolin-1 from which residues 1 to 81 were deleted, respectively, were kindly donated by J. Eggermont, Katholieke Universiteit, Leuven, Belgium. Plasmids were transfected into 80% confluent cell monolayers grown on coverslips using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After 48 h, cells were infected with the different virus strains as described above. The expression of wt dynamin and the K44A mutant was monitored by using a MAb against the HA tag, whereas the expression of wt caveolin and its mutant was monitored through GFP expression.

Transfection of siRNAs. Clathrin heavy chain small interfering RNA (siRNA) was obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO); the sequence of this siRNA was previously reported (2, 38). The siRNA used to knock down the expression of dynamin-2 was kindly provided by P. Cossart (Pasteur Institute, Paris, France) (57). As an irrelevant control, an siRNA to green fluorescent protein was used. Transfection of siRNAs into MA104 cells was performed using a reverse transfection method. Briefly, 15 μ l Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) was diluted in 1 ml MEM and incubated for 10 min at room temperature. This mixture was then added to a well of a 48-well plate containing the siRNA, also diluted in MEM. After an incubation of 20 min at room temperature, 200 μ l of a single-cell suspension of 0.5×10^5 MA104 cells/ml was added to each well, and the cells were incubated at 37°C. Seventy-two hours later, the transfection mixture was removed and the cells were washed twice with MEM and infected with rotavirus.

Lipofection of DLPs. siRNA-transfected cells were transfected with DLPs from different rotavirus strains using Lipofectamine (lipofection). Briefly, DLPs were diluted in MEM and incubated with a mixture of Lipofectamine (Invitrogen Carlsbad, CA) in MEM for 20 min at room temperature. One hundred microliters of this mixture was added to the cells for 1 h at 37°C, and then cells were washed with MEM. At 15 h postlipofection, cells were fixed, and infected cells were detected by a peroxidase focus-forming assay as described above.

Immunofluorescence (IF) assay. MA104 cells grown on glass coverslips to approximately 80% confluence were transfected with plasmids for transient expression assays or with siRNAs as described above, and at 48 h posttransfection (for plasmids) or 72 h posttransfection (for siRNAs), cells were infected with rotavirus or reovirus for 2 h at 37°C. Six hours postinfection (h.p.i.), the cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min. After this time, the cells were washed three times with PBS containing 50 mM NH₄Cl, permeabilized by incubation with 0.5% Triton X-100 in blocking buffer (50 mM NH₄Cl, 1% bovine serum albumin [BSA] in PBS) for 15 min, washed three times with PBS containing 50 mM NH₄Cl, and blocked by incubation with 1% BSA, 50 mM NH₄Cl in PBS at 4°C overnight. The coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h, followed by incubation with the corresponding Alexa-labeled secondary antibodies for 1 h. All incubations were performed at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Fluokeep (Argene, Varilhès, France), and slides were analyzed with a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 2 mot plus) coupled to a digital camera (Photometrics Cool Snap HQ). The images were then digitally captured and prepared in Adobe Photoshop 6.0.

Immunoblot analysis. Cells were lysed in Laemmli sample buffer, denatured by boiling for 5 min, subjected to SDS-PAGE, and transferred to Immobilon NC (Millipore) membranes. Membranes were blocked with PBS containing 5% nonfat dry milk and incubated with the antibodies indicated in Fig. 7 as previously described (36). Bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody and the Western Lightning system (PerkinElmer).

Image analysis and statistical analysis. For quantification, nonmanipulated raw images were assessed and counted for infected/transfected cells. In all instances, data were acquired from at least three independent experiments. All statistical evaluations were carried out with the two-tailed paired *t* test using Prism 5.0.

RESULTS

Kinetics of entry of different rotavirus strains. To determine if receptor usage had some influence in the mechanism of

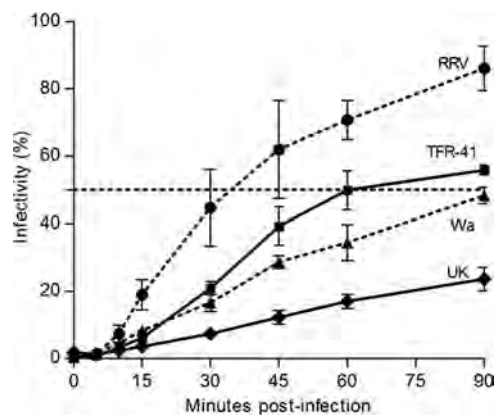


FIG. 1. Kinetics of rotavirus entry. MA104 cells grown in 96-well plates were infected with 2,000 FFUs of the indicated virus strains per well. Viral particles present at the cell surface were removed with 3 mM EGTA at the indicated time points, and the infection was allowed to proceed for 15 h at 37°C. Finally, cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity obtained in wells where viral particles of each strain were not removed with EGTA, which was taken as 100% infectivity. The arithmetic means and standard deviations of the results of three independent experiments performed in duplicate are shown.

rotavirus entry, we selected four rotavirus strains that have been shown to differ in their susceptibility to NA treatment of target cells and in their integrin dependence. Table 1 shows the four strains chosen for this study. As mentioned above, the interactions of rotavirus with the cell surface, as well as some aspects of the mechanism of entry, have already been characterized for the simian rotavirus RRV, which is NA sensitive and integrin dependent (5, 6, 17, 28, 33). Initially, we determined whether all four strains entered the cell at the same rate. For this, the different viruses were added to MA104 cell monolayers and allowed to bind for 1 h at 4°C; under these conditions, the viral particles bind to the cell surface but do not enter. Unbound viruses were washed off, and a synchronized entry process was started by adding warm medium to the cells. The entry of the viral particles was stopped at different times by removing the virus that had not entered cells with an EGTA wash, which releases the outer layer of the virions and causes the particles to detach from the cell surface. After this step, cells were incubated for 15 h and virus-infected cells were quantitated with an immunoperoxidase focus-forming assay. Figure 1 shows the results of these assays. The rate of entry of all four rotavirus strains differed greatly; RRV entered the cells with a half-time of about 35 min, whereas only 20% of strain UK had entered after 90 min of incubation. Strains TFR-41 and Wa had intermediate rates of entry, with half-times of approximately 60 and 90 min, respectively.

The infectivity of all four rotavirus strains depends on the presence of cholesterol. It has been shown that depletion of cholesterol from the cell membrane, using chelating agents such as methyl- β -cyclodextrin (M β CD), results in a severe decrease in the infectivity of the simian strain RRV, its variant nar3, and the human strain Wa (19). To determine if rotavirus strains TFR-41 and UK also depend on cholesterol for cell entry, the cells were treated with M β CD and the effect on the

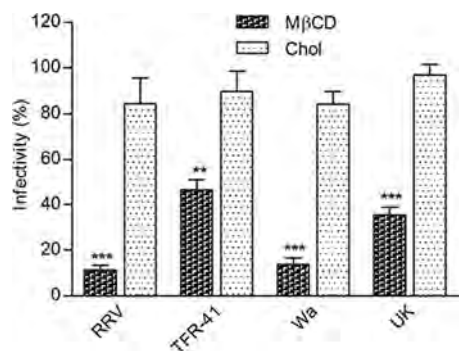


FIG. 2. Cholesterol depletion reduces the infectivity of all four rotavirus strains. MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with 10 mM M β CD for 1 h at 37°C and washed with MEM, and then, water-soluble cholesterol (100 μ g/ml) was added or not added to cells for 1 h at 37°C. Finally, all wells were infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strains. Fifteen h.p.i., infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay using a rabbit serum to rotavirus as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the number of FFUs observed in control untreated cells, which was taken as 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of four independent experiments performed in duplicate are shown.

infectivity of the viral strains was measured. The results in Fig. 2 show that all four rotavirus strains were susceptible to cholesterol depletion, suggesting that they all depend on the presence of cholesterol to infect the cells. To discard possible secondary effects associated with M β CD treatment, cholesterol was restored to cells after treatment with this drug and the infectivity was measured (Fig. 2). We found that cholesterol replenishment restored the infectivity of all rotavirus strains, suggesting that the presence of cholesterol is required for virus entry.

All rotavirus strains interact with hsc70. We have previously found that the heat shock protein hsc70 plays an important role as a postattachment receptor for RRV (18, 60). Here, we tested whether the other strains analyzed also used hsc70 during their interaction with the cell surface. In these assays, the cell monolayer was incubated with different concentrations of monoclonal antibodies directed to hsc70 or to hsp70 as a control. After this incubation, cells were infected with the different rotavirus strains and their infectivity was determined at 15 h.p.i. We found that the infectivity of Wa, TFR-41, and UK decreased by about 30 to 40% (depending on the viral strain) when the infection was performed in cells preincubated with the anti-hsc70 antibody, while the infectivity in cells that were preincubated with the control antibody to hsp70 was not affected (Fig. 3A and B). These results indicate that all four strains tested require the presence of hsc70 on the cell surface.

Preventing endosomal acidification affects the infectivity of some rotavirus strains. We and others (1, 25, 50) have found that preventing the acidification of endosomes does not affect the cell entry of RRV. Here, we tested the effects of NH $_4$ Cl and bafilomycin A1 on the infectivity of Wa, TFR-41, and UK. Cells were preincubated with these reagents and were then infected with the different rotavirus strains. The effect of preventing the acidification of endosomes on the infectivity was determined by the detection of infected cells as described in Materials and Methods at 15 h.p.i. (Fig. 4). As expected, the

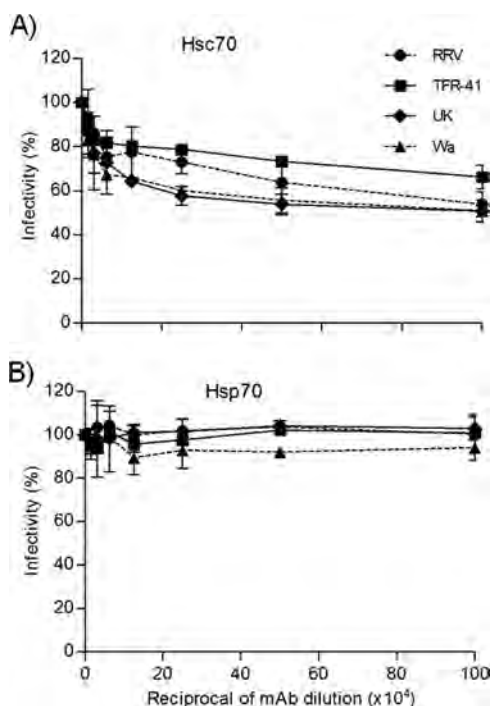


FIG. 3. Rotavirus infectivity is blocked by an antibody to hsc70. MA104 cells for 90 min at 37°C. After this incubation period, cells were infected with the indicated rotavirus strains (2,000 FFUs per well) for 1 h at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity when cells were preincubated with PBS as control. The arithmetic means \pm standard deviations of the results from at least two independent experiments are shown.

infectivity of RRV was not reduced by any of the concentrations of NH $_4$ Cl tested. In contrast, the infectivity of the other rotavirus strains was affected, as was the infectivity of reovirus that was used as a positive control. Similar results were obtained with bafilomycin A1, which prevents acidification of the endosomes by inhibiting the vacuolar ATPase (12). The infectivity of RRV with this treatment was slightly but statistically significantly affected (Fig. 4). Taken together, these data suggest that strains TFR-41, Wa, and UK depend on the acidification of the endosome to efficiently infect MA104 cells, while RRV seems to be less sensitive to changes in the endosomal pH.

The low endosomal pH might be required to trigger conformational changes in some of the viral proteins needed for the virus to escape the endosomal compartment. Alternatively, an acidic pH might be required for optimal function of the endosomal cysteine proteases cathepsin L and cathepsin B, whose activity has been shown to be required for reovirus infectivity (14). To determine if cathepsin L was needed for rotavirus entry, we tested the effect of an inhibitor of this protease on the infectivity of the different rotavirus strains. Reovirus was used as a positive control for these experiments. We found that while the inhibition of cathepsin L severely blocked the infectivity of reovirus at the concentration tested, it did not signif-

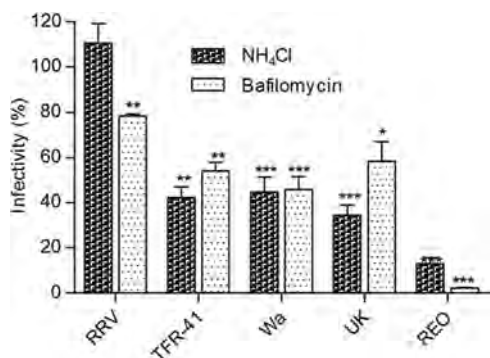


FIG. 4. Effects on rotavirus infectivity of treatments that prevent the acidification of endosomes. MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with 100 mM NH₄Cl or with 0.5 μ M bafilomycin A1 at 37°C for 30 min or 1 h, respectively. Cells were then infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strains, maintaining the reagents during the adsorption period of 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity observed in control untreated cells, taken as 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least five independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

icantly affect the infectivity of any rotavirus strain (data not shown).

Macropinocytosis and caveola-mediated endocytosis are not involved in rotavirus entry. To test whether some rotavirus strains enter cells through macropinocytosis or caveola-mediated endocytosis, we inhibited these two pathways and determined the effect on rotavirus infection. To inhibit the caveolin-dependent route, we transfected the cells with a construct expressing a dominant-negative mutant form of caveolin-1 (with amino acids 1 to 81 deleted) or with a plasmid encoding the wild-type form of this protein (54). The results in Fig. 5A show that cells expressing the dominant-negative mutant caveolin-1 were infected by all four rotavirus strains but were not infected by SV40, which has been previously shown to enter through caveola-mediated endocytosis and which was used as a positive control in these assays.

To block macropinocytosis, we treated the cells with 5-(*N,N*-dimethyl)amiloride hydrochloride (DMA), an inhibitor of the Na⁺/H⁺ pump, which has been shown to inhibit this pathway (31). None of the rotavirus strains tested were affected by this treatment (Fig. 5B), whereas the uptake of fluorescently labeled dextran, which is known to enter through macropinocytosis, was inhibited (data not shown). Together, these results suggest that neither macropinocytosis nor caveola-mediated endocytosis is involved in rotavirus entry.

Treatments that inhibit clathrin-mediated endocytosis alter the infectivity of some rotavirus strains. To establish if clathrin-dependent endocytosis is involved in the entry of the strains studied, we determined the effect of treating MA104 cells with a hypertonic medium (containing sucrose at different concentrations), which results in the dissociation of clathrin vesicles from the plasma membrane (20, 21). The results in Fig. 6A show that, while the infectivity of RRV was barely affected at 250 mM, the highest sucrose concentration tested, the infectivity of the other three strains and reovirus decreased signif-

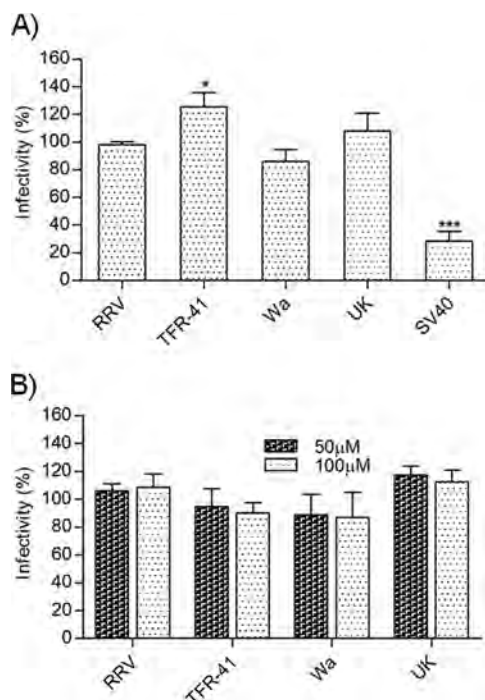


FIG. 5. Blocking caveola-mediated endocytosis or macropinocytosis does not reduce rotavirus infectivity. (A) MA104 cells were transfected with plasmids expressing wild-type or the dominant-negative mutant of caveolin-1. Transfected cells were infected with the different viruses and processed for IF assay. Both wild-type and mutant proteins were detected through GFP expression. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. The numbers of infected cells in the GFP-positive transfected cells were scored ($n \geq 100$), and infectivities are expressed as percentages of the infected cell number in the cells transfected with wild-type or dominant-negative constructs. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments are shown. (B) MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with the indicated concentrations of DMA at 37°C for 30 min. Cells were then infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strain, maintaining DMA during the adsorption period of 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentages of the virus infectivity observed in control untreated cells, representing 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

icantly. These results point out the fact that different rotavirus strains may enter the cells through different pathways.

To confirm the role of the clathrin-mediated endocytosis pathway in the entry of some rotavirus strains, we silenced the expression of the clathrin heavy chain by RNA interference (RNAi), treatment that blocks the formation of clathrin cages, and in consequence, the uptake of clathrin-mediated endocytosis ligands, such as transferrin (38). Cells were transfected with an siRNA directed to the clathrin heavy chain, and at 72 h posttransfection, the cells were infected with different rotavirus strains. At 6 h.p.i., cells were fixed and stained with antibodies to clathrin and to rotavirus, and the number of infected cells that were transfected with the siRNA against clathrin were counted and compared with the number of infected cells that were detected when an irrelevant siRNA was used as a control.

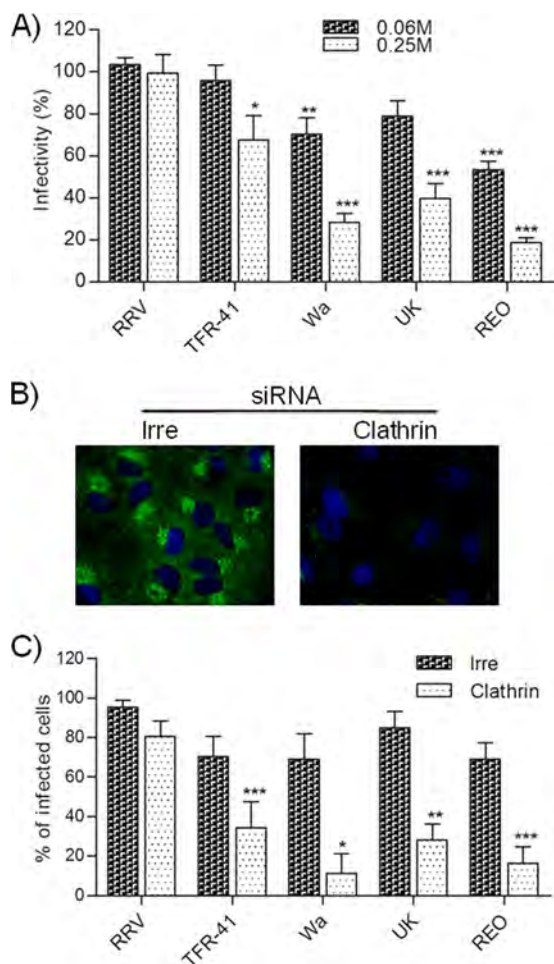


FIG. 6. Effects on rotavirus infectivity of treatments that affect clathrin-mediated endocytosis. (A) MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with the indicated concentrations of sucrose for 10 min at 37°C. Cells were then infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strains, maintaining the hypertonic medium during the adsorption period of 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity observed in control untreated cells, which represents 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of five independent experiments performed in duplicate are shown. (B) Immunofluorescence assay showing the silencing of clathrin heavy chain. MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs (Irre, irrelevant GFP siRNA); at 72 h post-transfection, the cells were fixed and processed for IF using an antibody to the clathrin heavy chain (green), and the nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). (C) MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs and, at 72 h posttransfection, were infected with the different strains of rotavirus or reovirus. At 6 h.p.i., cells were fixed and processed for IF as indicated in Materials and Methods. Rotavirus-infected cells were monitored using an anti-NSP2 rabbit antibody, and reovirus-infected cells were detected by an anti-reovirus rabbit antibody, followed by incubation with antirabbit Alexa 568. The numbers of infected cells were scored, and the infectivities are expressed as percentages of the numbers of infected cells found in the cells transfected with the siRNAs ($n \geq 150$). The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

The results in Fig. 6B show that there was a very efficient knockdown of the expression of clathrin, since few cells (approximately 10% of the control-transfected cells) were still able to express this protein. Under these conditions, the uptake of fluorescently labeled transferrin was blocked (data not shown). When the effect on infectivity of silencing this protein was measured, we found that the infectivity of RRV was not significantly affected by this treatment, confirming our previous results (50). In contrast, the infectivity of TFR-41, UK, Wa, and reovirus was decreased when the clathrin heavy chain was knocked down. The human strain Wa appeared to be the most sensitive, since there was about an 80% reduction of its infectivity under these conditions (Fig. 6C).

Role of dynamin in rotavirus entry. Dynamin is a large GTPase that is responsible, among other things, for scission of vesicles from the plasma membrane (10). A dominant-negative mutant form of dynamin II, mutant K44A that contains a single amino acid change in the GTPase domain, has been used extensively to inhibit both caveolar and clathrin endocytosis and to define the role of these pathways in the cell entry of several viruses (16, 24, 44, 58). In order to define the role of dynamin in the entry of rotaviruses, MA104 cells were transiently transfected with plasmids that encode either Dyn-wt or the mutant Dyn-K44A, as described in Materials and Methods. The transfected cells were then infected with the different strains of rotavirus or with reovirus, and the number of transfected cells (as detected by an anti-HA antibody [see Materials and Methods]) that were infected was scored (Fig. 7A). We found that the infectivity of all the strains tested was decreased by about 70%, suggesting that dynamin is involved in the entry of all rotavirus strains tested.

Dynamin and clathrin are important during the entry step of rotaviruses. Since it was conceivable that the knockdown of either clathrin or dynamin affected the infectivity of rotaviruses at a postentry step (39, 48), we analyzed whether the inhibitory role of these two proteins was during the entry process. For this, the expression of dynamin and clathrin was silenced by RNAi and cells were transfected with purified DLPs from RRV, TFR-41, and UK viruses. DLPs lack the outer layer proteins and, thus, are not able to bind and enter MA104 cells. Transfection of DLPs into cells overcomes the entry step of the virions. If the absence of clathrin or dynamin were affecting a process after viral entry, we would expect the infectivity of the transfected DLPs to be decreased. We found that silencing the expression of clathrin or dynamin did not affect the infectivity of any of the viral strains tested (Fig. 7B), suggesting that the effect of their absence is indeed at the virus entry level. The knockdown effectiveness of each of these proteins was assessed by Western blot analysis (Fig. 7C). The protein level of the clathrin heavy chain was reduced almost 100%, whereas there was approximately 11% dynamin II still expressed in siRNA-transfected cells. We were not able to purify enough viral particles from the human strain Wa to perform these assays, but they would be expected to behave like the other rotavirus strains.

DISCUSSION

The early interactions of rotavirus with its host cell have been extensively characterized for simian strain RRV (19, 50,

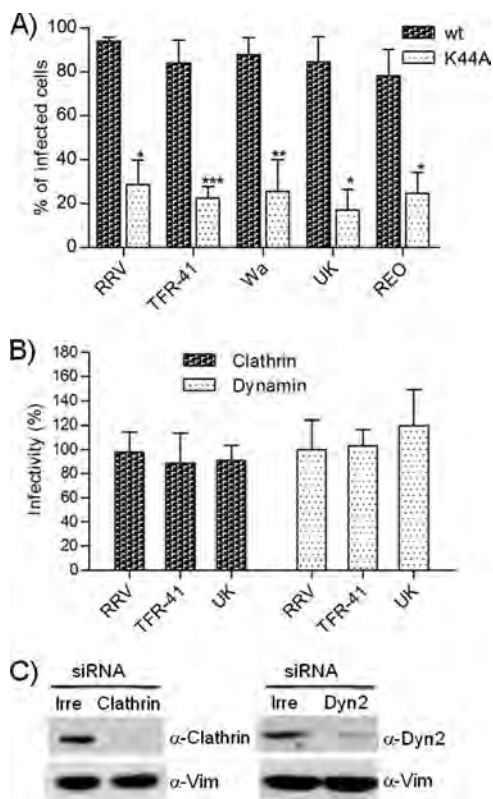


FIG. 7. Rotavirus entry depends on clathrin and dynamin II. (A) MA104 cells were transfected with plasmids expressing the wild type or the K44A form of dynamin II. Transfected cells were infected with the different viruses and processed for IF. Both wild-type and K44A proteins were detected with an anti-HA tag MAAb. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. The numbers of infected cells in the HA-positive transfected cells were scored ($n \geq 100$), and the infectivities are expressed as the percentages of the infected cell number in the cells transfected with wild-type or dominant-negative constructs. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments are shown. REO, reovirus. (B) siRNA-transfected cells were transfected with DLPs of the indicated rotavirus strains for 1 h at 37°C. After this period, the transfection mixture was removed and cells were kept in MEM. At 15 h.p.i., cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. The data are expressed as the percentage of the number of FFUs observed in the control (irrelevant siRNA-transfected cells), which represents 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test). (C) Immunoblot analysis of cell lysates from cells transfected with the indicated siRNA (Irre, irrelevant GFP siRNA). The antibodies used are indicated as follows: α -Clathrin, anti-clathrin heavy chain; α -Dyn2, antidyminin; α -Vim, antivimentin (used as a loading control).

60); however, differences among rotavirus strains in their use of cellular receptors (5, 6, 17, 34) leave open the question of whether they all enter the cell through the same pathway. We chose four rotavirus strains that differ in their requirements of interaction with sialic acids and integrins. RRV was used as a strain representative of the NA-sensitive, integrin-dependent phenotype and for comparison with the other strains selected (Table 1).

We initially evaluated the entry rates of the four selected strains and found that each strain entered the cell at a different

rate (Fig. 1). Despite these differences, all four strains depended on the presence of cholesterol on the cell surface. Interestingly, the only interaction that all strains had in common with the previously characterized rotavirus receptors was with the heat shock cognate protein hsc70, since antibodies to this protein blocked the infectivity of all four strains at very similar levels.

When the effect on viral infectivity of preventing the acidification of endosomes was determined, we found that the entry of strains TFR-41, Wa, and UK was pH dependent, while RRV did not seem to require a low endosomal pH, although a slight but significant effect of bafilomycin A was observed for this strain. The inhibition of cathepsin L did not affect the infectivity of any of the four rotavirus strains tested (results not shown), suggesting that the dependence of TFR-41, Wa, and UK on endosomal acidification is not due to a requirement of the activation of this protease. Since viruses internalized through clathrin-mediated endocytosis usually require an acidic environment (42), we evaluated the role of this endocytic pathway in the entry of the different strains. To our surprise, and in contrast to our previous findings with RRV, we found that treatment of cells with a hypertonic medium, which precludes the formation of clathrin cages, and silencing the expression of the clathrin heavy chain, which is an essential component of the clathrin triskelion (15, 59), decreased the infectivity of all the strains except RRV, suggesting that the entry of these viruses is through a clathrin-mediated endocytosis. Accordingly, we also found that all viruses tested depended on the presence of a functional dynamin.

The use of reovirus type 1 as a positive control for many of the assays performed in this work demonstrated that this virus enters MA104 cells through clathrin-mediated endocytosis, as has been described in L cells (30). This observation is interesting in light of recent findings that have established that the entry route of some viruses depends not only on the virus but also on the cell line tested. For example, SV40, a virus whose entry has been extensively studied, behaved differently in CV1 cells, where the virus enters through caveolae, and in Huh-7 cells, where the virus does not use this entry pathway (9, 43). As has been shown previously (50) and in this study, SV40 enters MA104 cells through a caveolin-dependent pathway.

The results presented in this work show that different rotavirus strains differ not only in their receptor usage but also in their entry pathway. Table 2 summarizes the results found in

TABLE 2. Summary of the results obtained in this work

Treatment	Effect on infectivity of strain:			
	RRV	TFR-41	UK	Wa
MBCD	***	***	***	***
Hsc70	**	**	**	**
NH ₄ Cl	—	***	***	***
Bafilomycin A1	*	**	***	**
Sucrose	—	**	***	***
Clathrin	—	***	***	***
Caveolae	—	—	—	—
Macropynocytosis	—	—	—	—
Dynamin	***	***	***	***

—, no effect; *, <30% reduction; **, 30 to 50% reduction; ***, >50% reduction.

this study. Interestingly, a correlation between the cell receptors used and their entry pathway was not found. RRV, the virus that seems to enter cells faster, is the only virus that does not enter the cell via clathrin- or caveola-mediated endocytosis (50; this work) or macropinocytosis (this work). The other three virus strains tested depend on clathrin-mediated endocytosis (caveolin-dependent or macropinocytosis uptake were ruled out).

The findings in this work could help to clarify the different, sometimes even contradictory results which have been reported in the literature when characterizing different rotavirus strains (22). For instance, different results have been reported for the role of low pH on entry and for the role of the Ca^{2+} concentration necessary for viral uncoating. It was reported that the infectivities of porcine strain OSU and simian strain SA11 were affected when the cells were treated with bafilomycin A1, an inhibitor of the endosomal H^+ -ATPase (12), whereas under the same conditions, the infectivity of RRV was not affected (3, 8). Similar results were obtained when compounds that raise the intracellular calcium concentration were used with different rotavirus strains (8, 29). These apparently contradictory results might be explained by intrinsic differences in the rotavirus strains used in each work, and most probably not by the different experimental conditions employed. It is also important to point out that the rotavirus strains that have been used in these studies have been adapted to grow in cell culture for a long time, and their entry modes may differ from those of wild-type strains when infecting enterocytes.

It has already been observed that viruses belonging to the same genus use different endocytosis pathways to infect the host cell. Human rhinovirus 14 (HRV14) and HRV2 use different receptors for host cell attachment and, similar to rotavirus strains, the uptake of these rhinoviruses by the cells is different; HRV2 enters through the clathrin-mediated pathway, whereas HRV14 entry is independent of clathrin, caveolin, and flotillin (26, 51). This phenomenon is also illustrated among the *Polyomaviridae* family; human polyomaviruses JCV and BKV enter the cell through clathrin-dependent and caveola-mediated endocytosis, respectively (13, 37, 45–47), although they finally converge in the endoplasmic reticulum (47). The observation that rotaviruses isolated from different animal origins use distinct entry mechanisms is thus not unexpected. It is tempting to speculate that rotavirus affinity, the order of interactions, or the signaling molecules activated through virus binding to its receptors may induce a particular endocytic mechanism. It remains to be determined whether or not the vesicular trafficking used by all these viruses converges at some point such that they share their final destination in the cell's cytoplasm to start transcription at the same cellular site.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pedro Romero for his help in virus purification and to Paul Gaytan and Eugenio Lopez for their support with the synthesis of oligonucleotides.

This work was supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, grant IN210807 from DGAPA-UNAM, and grant 60025 from CONACyT. M.G. is the recipient of a scholarship from CONACyT.

REFERENCES

- Bass, D. M., M. Baylor, C. Chen, and U. Upadhyayula. 1995. Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology* **212**:429–437.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**:6964–6972.
- Chemello, M. E., O. C. Aristimuno, F. Michelangeli, and M.-C. Ruiz. 2002. Requirement for vacuolar H^+ -ATPase activity and Ca^{2+} gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J. Virol.* **76**:13083–13087.
- Chu, J. J., and M. L. Ng. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* **78**:10543–10555.
- Ciarlet, M., and M. K. Estes. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* **80**:943–948.
- Ciarlet, M., J. E. Ludert, M. Iturriza-Gomara, F. Liprandi, J. J. Gray, U. Desselberger, and M. K. Estes. 2002. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J. Virol.* **76**:4087–4095.
- Crawford, S. E., S. K. Mukherjee, M. K. Estes, J. A. Lawton, A. L. Shaw, R. F. Ramig, and B. V. Prasad. 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J. Virol.* **75**:6052–6061.
- Cuadras, M. A., C. F. Arias, and S. Lopez. 1997. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* **71**:9065–9074.
- Damm, E. M., L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Mezzacasa, T. Kurzchalia, and A. Helenius. 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**:477–488.
- Danino, D., and J. E. Hinshaw. 2001. Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:454–460.
- Dormitzer, P. R., E. B. Nason, B. V. Prasad, and S. C. Harrison. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* **430**:1053–1058.
- Drose, S., and K. Altendorf. 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**:1–8.
- Eash, S., W. Querbes, and W. J. Atwood. 2004. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J. Virol.* **78**:11583–11590.
- Espejo, R. T., S. Lopez, and C. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**:156–160.
- Fotin, A., Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, and T. Walz. 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**:573–579.
- Ghigo, E., J. Kartenbeck, P. Lien, L. Pelkmans, C. Capo, J. L. Mege, and D. Raoult. 2008. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog.* **4**:e1000087.
- Graham, K. L., P. Halasz, Y. Tan, M. J. Hewish, Y. Takada, E. R. Mackow, M. K. Robinson, and B. S. Coulson. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* **77**:9969–9978.
- Guerrero, C. A., D. Bouyssouade, S. Zarate, P. Isa, T. Lopez, R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, S. Lopez, and C. F. Arias. 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* **76**:4096–4102.
- Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362–9371.
- Hansen, S. H., K. Sandvig, and B. van Deurs. 1993. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* **121**:61–72.
- Heuser, J. E., and R. G. Anderson. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**:389–400.
- Isa, P., M. Gutierrez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2008. Rotavirus cell entry. *Future Virol.* **3**:135–146.
- Isa, P., M. Realpe, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**:370–381.
- Johannsdottir, H. K., R. Mancini, J. Kartenbeck, L. Amato, and A. Helenius. 2009. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J. Virol.* **83**:440–453.
- Kaljit, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**:1136–1144.
- Khan, A. G., A. Pickl-Herk, L. Gajdzig, T. Marlovits, R. Fuchs, and D. Blaas. 2010. Human rhinovirus 14 enters rhabdomyosarcoma cells expressing ICAM-1 by a clathrin, caveolin, and flotillin-independent pathway. *J. Virol.* **84**:3984–3992.
- Lopez, S., and C. F. Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**:271–278.

28. **Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg.** 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* **70**:487–493.
29. **Ludert, J. E., F. Michelangeli, F. Gil, F. Liprandi, and J. Esparza.** 1987. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* **27**:95–101.
30. **Maginnis, M. S., B. A. Mainou, A. Derdowski, E. M. Johnson, R. Zent, and T. S. Dermody.** 2008. NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J. Virol.* **82**:3181–3191.
31. **Marechal, V., M. C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* **75**:11166–11177.
32. **Mayor, S., and R. E. Pagano.** 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:603–612.
33. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**:5253–5259.
34. **Mendez, E., S. Lopez, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias.** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**:450–459.
35. **Mercer, J., and A. Helenius.** 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**:531–535.
36. **Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **82**:1496–1504.
37. **Moriyama, T., J. P. Marquez, T. Wakatsuki, and A. Sorokin.** 2007. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J. Virol.* **81**:8552–8562.
38. **Motley, A., N. A. Bright, M. N. Seaman, and M. S. Robinson.** 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**:909–918.
39. **Nicoziani, P., F. Vilhardt, A. Llorente, L. Hilout, P. J. Courtoy, K. Sandvig, and B. van Deurs.** 2000. Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol. Biol. Cell* **11**:481–495.
40. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200.
41. **Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass.** 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:565–572.
42. **Pelkmans, L., and A. Helenius.** 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**:414–422.
43. **Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**:473–483.
44. **Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius.** 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**:535–539.
45. **Pho, M. T., A. Ashok, and W. J. Atwood.** 2000. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol.* **74**:2288–2292.
46. **Querbes, W., A. Benmerah, D. Tosoni, P. P. Di Fiore, and W. J. Atwood.** 2004. A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J. Virol.* **78**:250–256.
47. **Querbes, W., B. A. O'Hara, G. Williams, and W. J. Atwood.** 2006. Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J. Virol.* **80**:9402–9413.
48. **Royle, S. J., and L. Lagnado.** 2006. Trimerisation is important for the function of clathrin at the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* **119**:4071–4078.
49. **Rust, M. J., M. Lakadamyali, F. Zhang, and X. Zhuang.** 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:567–573.
50. **Sanchez-San Martin, C., T. Lopez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**:2310–2318.
51. **Snyers, L., H. Zwickl, and D. Blaas.** 2003. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **77**:5360–5369.
52. **Stang, E., J. Kartenbeck, and R. G. Parton.** 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* **8**:47–57.
53. **Sun, X., V. K. Yau, B. J. Briggs, and G. R. Whittaker.** 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**:53–60.
54. **Trouet, D., D. Hermans, G. Droogmans, B. Nilius, and J. Eggermont.** 2001. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**:461–465.
55. **Tsai, B.** 2007. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**:23–43.
56. **van der Schaar, H. M., M. J. Rust, C. Chen, E.-M. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X. Zhuang, and J. M. Smit.** 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* **4**:e1000244.
57. **Veiga, E., and P. Cossart.** 2005. Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **7**:894–900.
58. **Wang, K., S. Huang, A. Kapoor-Munshi, and G. Nemerow.** 1998. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J. Virol.* **72**:3455–3458.
59. **Young, A.** 2007. Structural insights into the clathrin coat. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**:448–458.
60. **Zarate, S., M. A. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. O. Juarez, M. Camacho-Nuez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* **77**:7254–7260.

MECANISMOS DE ENTRADA DE VIRUS: UNA MANERA DE CONOCER A LA CÉLULA

Michelle Gutiérrez* y Susana López

Depto. de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular,
Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos,
México. C.P. 62210. E-mail*: mayret@ibt.unam.mx

RESUMEN

Los virus representan una versión microscópica del caballo de Troya, en la que hacen uso de procesos celulares para poder entrar a la célula e infectarla. La endocitosis es uno de estos procesos que los virus han aprovechado para poder ser internalizados. En esta revisión se presentan las distintas vías de endocitosis conocidas hasta el momento, así como ejemplos de distintos virus que utilizan cada ruta para ingresar a la célula.

Palabras Clave: Caveolas, clatrina, dinamina, endocitosis, entrada de virus.

ABSTRACT

Viruses represent a microscopic version of the Trojan horse by mimicking processes known to the cell to get inside and infect it. Endocytosis is one of these processes that viruses take advantage of to be internalized. In this review, the distinct endocytic pathways known to date are discussed. In addition, a brief overview of the entry of different viruses known to use each of these routes is provided.

Key Words: Caveolae, clathrin, dynamin, endocytosis, virus entry.

INTRODUCCIÓN

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos. Este proceso consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares como son la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis, tanto celular como del organismo completo.

Este proceso celular está constituido por una red de varios organelos los cuales difieren en su composición proteica y propiedades bioquímicas (Figura 1).

Existen diferentes rutas de endocitosis que son usadas por la célula para llevar a cabo distintas funciones (Figura 1)^{1,2}. Sin embargo, dados los avances metodológicos recientes, así como

la complejidad de este proceso, se siguen encontrando nuevas rutas cuya caracterización es aún incompleta.

Existen varios criterios para clasificar los diferentes tipos de endocitosis, éstos son: el tipo de molécula que se internaliza (toxina, virus, ligando, receptor), el componente que cubre la vesícula (clatrina, caveolina, flotilina, etc.), la participación de GTPasas en el proceso, el mecanismo de escisión de la vesícula de la membrana y la participación del citoesqueleto de actina, entre otros¹.

La presencia de las GTPasas de la familia Rab contribuye a la diferenciación entre los distintos tipos de endosomas. Estas GTPasas son importantes en la regulación del tráfico intracelular porque regulan la fusión de las vesículas a los endosomas. De manera general, la unión del ligando al receptor favorece la formación de la vesícula endocítica. Esta vesícula entrega su carga a los endosomas tempranos (o endosomas de distribución), organelos con un pH alrededor de 6 donde se localizan las Rab GTPasas 4 y 5. En los casos donde la molécula endocitada es un receptor unido a su ligando, el pH ácido puede promover la

Nota: Artículo recibido el 24 de mayo de 2010 y aceptado el 14 de junio de 2010.

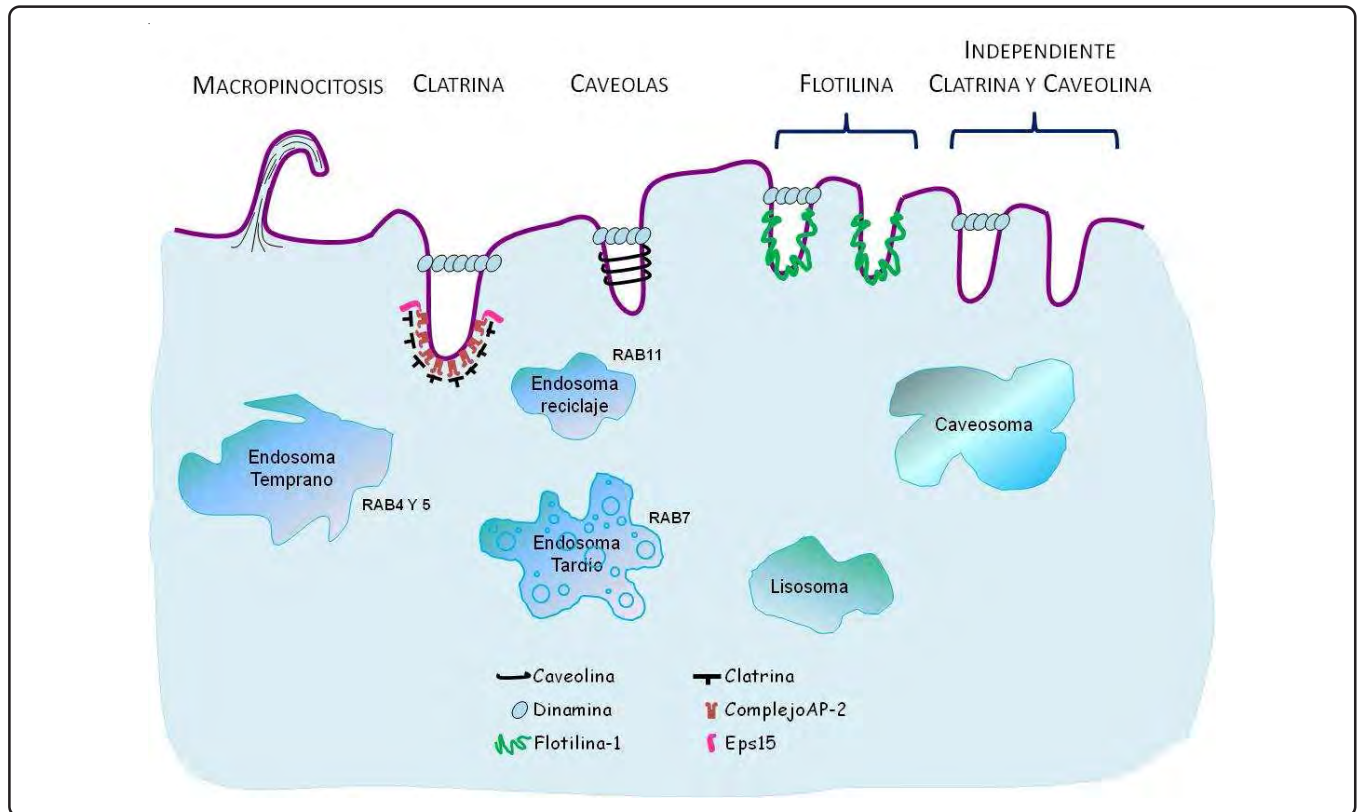


Figura 1. Esquema general de las diferentes rutas de endocitosis. Se muestran las distintas vías de endocitosis y la maquinaria molecular asociada a cada ruta.

disociación del ligando de su receptor. Usualmente, el ligando, el cual permanece en la vía, es degradado, mientras que el receptor entra a los endosomas de reciclamiento (donde está localizada Rab11) para regresar a la membrana celular. Las moléculas que son destinadas a su degradación o que requieren llegar al interior celular, cerca del núcleo, entran a los endosomas tardíos (también conocidos como cuerpos multivesiculares -MVBs-). En estos organelos, con un pH menor a 6, se localiza la GTPasa Rab 7. Finalmente, la molécula endocitada llega a los lisosomas donde puede ser degradada por enzimas que están activas en un ambiente ácido. En el transcurso de toda la ruta endocítica, existen posibles rutas de escape para evitar la degradación en los lisosomas (Figura 1).

A continuación se da una breve descripción de las rutas más conocidas hasta el momento que han sido clasificadas de acuerdo a las proteínas que recubren las vesículas endocíticas.

Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de moléculas a la célula. Este tipo de endocitosis requiere una serie de componentes estructurales para poder formar la vesícula de manera que pueda ser internalizada. Uno de estos componentes, y por el cual esta vía recibe su nombre, es la clatrina.

La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada "el trisqueleto" (triskelion) de clatrina³. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras, es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β 2, μ 2 y σ 2). El complejo AP-2 interactúa con clatrina, a través de la subunidad β 2, y estimula su polimerización generando una malla de clatrina que cubre la vesícula (Figura 2)⁴. Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta que se forma la vesícula endocítica. La fisión de la vesícula cubierta con clatrina es controlada por la GTPasa dinamina. Se ha propuesto que la dinamina actúa como una mecano-enzima la cual usa la hidrólisis de GTP para generar la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana (Figura 2)⁵.

Existen diferentes maneras de inhibir esta vía de endocitosis. Desde agentes químicos como sacarosa o clorpromazina hasta siRNAs o mutantes dominantes negativas de los componentes estructurales de la vía (Tabla I).

Endocitosis mediada por caveolas

La segunda vía de endocitosis mejor caracterizada es la mediada por caveolas. En esta ruta, las caveolinas son el principal componente estructural. A diferencia de clatrina que requiere

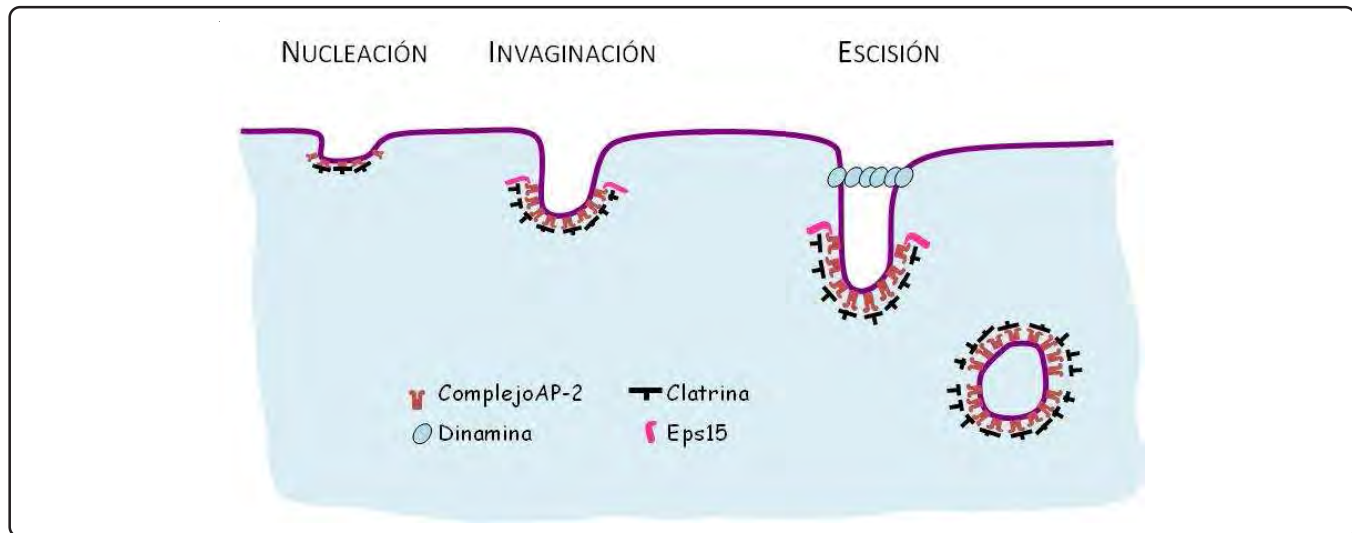


Figura 2. Formación de las vesículas de clatrina. Se muestran los pasos secuenciales involucrados en la endocitosis mediada por clatrina y algunos de los componentes claves que participan en cada etapa.

Vía	Inhibidor	Efecto	Observaciones
Dependiente de Clatrina	Clorpromazina	Inhibe el ensamble de la malla de clatrina ⁴³	Puede afectar la fluidez y permeabilidad de la membrana ⁴⁴
	Medio sin potasio/con sacarosa	Polimerización anormal de clatrina. Remueve las vesículas cubiertas de la membrana ^{45,46}	La disminución de potasio en el medio puede tener otros efectos como la inhibición del transporte de proteínas secretoras ⁴⁷
	Mutantes dominantes negativos de eps15	Evita el reclutamiento de AP-2 a la membrana celular, inhibiendo la formación de la malla de clatrina ⁴⁸	No inhibe aquellas vesículas con cubierta de clatrina que no dependen del complejo AP-2 ⁴⁹
	siRNAs cadena pesada de clatrina	Inhiben específicamente la expresión de clatrina ⁴³	
Dependiente de Caveola	Ciclodextrina	Secuestra el colesterol de la membrana ³⁹	Puede provocar efectos no específicos ⁵⁰
	Mutante dominante negativa de caveolina	Inhibe la asociación de la caveolina a las balsas lipídicas ⁵¹	
	siRNAs caveolina	Inhibe específicamente la expresión de caveolina ³⁹	
Macropinocitosis	Citocalasina D	Previene la polimerización de actina ^{52,53}	Puede inhibir la entrada de moléculas que entran por otras rutas de endocitosis ⁵⁴
	Amilorida	Inhibe intercambiadores Na^+/H^+ ¹³	Inespecífico ⁵⁵
	Toxina B de <i>C. difficile</i>	Inhibe a las GTPasas Rac, Cdc42 y Rho ⁵⁶	Las Rho GTPasas pueden participar en otras vías ^{15,17}

Tabla I. Estrategias usadas para el estudio de los distintos componentes y vías de la endocitosis.

proteínas accesorias para ser reclutada a la membrana, las caveolinas son proteínas integrales que están asociadas a microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos también llamados balsas lipídicas⁶. La formación de la caveola depende de la expresión de caveolina-1 en células no musculares y de caveolina-3 en células de músculo⁶. Estas proteínas forman oligómeros que cubren las vesículas, las cuales son liberadas de la membrana plasmática, a través de la acción de dinamina, a estructuras llamadas caveosomas presentes en el interior de la célula (Figura 1)⁷. La ausencia de marcadores para endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje indica que estas estructuras representan un nuevo tipo de organelos⁷. A diferencia de los endosomas, estos organelos tienen pH neutro.

El tratamiento de las células con genisteína, un inhibidor de tirosin cinasas extraído de la soya, bloquea la invaginación de las caveolas⁸. Se sabe que la cinasa Src fosforila a la caveolina-1 en la tirosina 14 y esto incrementa la dinámica de las caveolas. En la Tabla I se muestran otras maneras diferentes para inhibir esta vía.

Macropinocitosis

A diferencia de las otras vías de endocitosis, la macropinocitosis involucra la remodelación de grandes extensiones de la membrana plasmática a través de cambios en el citoesqueleto de actina lo que culmina con la internalización de fluido en grandes vacuolas llamadas macropinosomas (Figura 1)^{9,10}. Éste es un proceso transitorio comúnmente inducido por factores de crecimiento que activan receptores de tirosin cinasas promoviendo cascadas de señalización que inducen cambios en el citoesqueleto de actina y en la membrana plasmática.

Entre las proteínas involucradas en el proceso de regulación de la macropinocitosis se encuentran las GTPasas Rac y Cdc42 las cuales activan a la cinasa PAK1 encargada de regular la dinámica del citoesqueleto de actina¹¹. Además, PAK1, cinasa que fosforila serinas y treoninas, activa a la proteína CtBP1 que es necesaria para que se cierre el macropinosoma¹². La inhibición de los intercambiadores Na⁺/H⁺ por amilorida o derivados de ésta, bloquean esta vía¹³. Además, agentes que alteran la polimerización del citoesqueleto de actina y mutantes dominantes negativos de Rac, Cdc42 o PAK1, también afectan este mecanismo de endocitosis^{13,14}. Es importante mencionar que estas proteínas tienen otras funciones en la célula y es necesario combinar estrategias experimentales para asegurar que el cargo en particular que se está estudiando utiliza esta vía de entrada (Tabla I).

Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

Algunas vías de endocitosis han sido parcialmente caracterizadas recientemente y se han observado que son independientes tanto de clatrina como de caveolina y, sin embargo, pueden o no depender de dinamina¹.

Por ejemplo, la internalización del receptor de la interleucina 2 (IL-

2) se caracteriza por su independencia a clatrina y caveolina, su dependencia a dinamina y a colesterol. Además, el uso de mutantes dominantes negativos de la GTPasa RhoA, encargada de la remodelación del citoesqueleto de actina, demostró que esta vía está regulada por esta enzima¹⁵. La endocitosis del receptor de citocinas γ c, que requiere de la polimerización de actina, también se lleva a cabo de esta manera¹⁶.

Un ejemplo de cargos que entran por una vía independiente de dinamina son las proteínas ancladas a glicosil-inositol-fosfato (GPI). En general, las proteínas ancladas a GPI entran a la célula por esta vía y son dirigidas a compartimentos endosomales tempranos enriquecidos en proteínas ancladas a GPI, GEECs (por sus siglas en inglés de GPI-AP enriched early endosomal compartments)¹⁷. Los GEECs son compartimentos endosomales distintos, que no colocalizan con caveolina. La inhibición de la endocitosis mediada por clatrina, y el uso de mutantes de dinamina, no inhiben la internalización de estas proteínas. La expresión de una dominante negativa de la GTPasa cdc42 sí inhibe esta vía¹⁷.

A principios del 2006, Glebov *et al.*, encontraron que flotilina-1, una proteína marcadora de balsas lipídicas, participa en una nueva vía de endocitosis (Figura 1)¹⁸. Esta novedosa ruta fue caracterizada por la internalización de proteínas asociadas a glicosilfosfatidilinositol (específicamente, CD59-GPI). Estos investigadores encontraron que estas proteínas entran a la célula a través de una vía que es dependiente de flotilina pero independiente de clatrina, caveolina y dinamina¹⁸. Por otro lado, Payne *et al.*, mediante el uso de drogas, RNAi y la expresión transitoria de proteínas descubrieron que la entrada de los proteoglicanos es independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina¹⁹. Además, encontraron que estas moléculas y sus ligandos entran directamente a los endosomas tardíos dado que los complejos (proteoglicanos y sus ligandos catiónicos) colocalizan con Rab9 pero no con Rab5¹⁹.

Endocitosis como vía de entrada de virus

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios formados por una cubierta proteica (cápside) que rodea el material genético. Algunos virus tienen además, una envoltura lipídica proveniente de la célula que infectó previamente rodeando su cápside. El ciclo replicativo de cualquier virus comienza con la unión de éste a sus receptores (entre ellos integrinas, gangliósidos, glicoproteínas, etc.) lo cual provoca cambios en la partícula viral que favorecen las siguientes etapas. Una vez que el virus ha reconocido a sus receptores, el siguiente paso es la penetración de la membrana celular. Este paso puede darse a nivel de la membrana plasmática o en membranas intracelulares de diferentes organelos dependiendo de los requerimientos de cada virus. Muchos virus utilizan las vías de endocitosis para entrar a la célula, mientras que pocos atraviesan directamente la membrana celular por un mecanismo llamado penetración

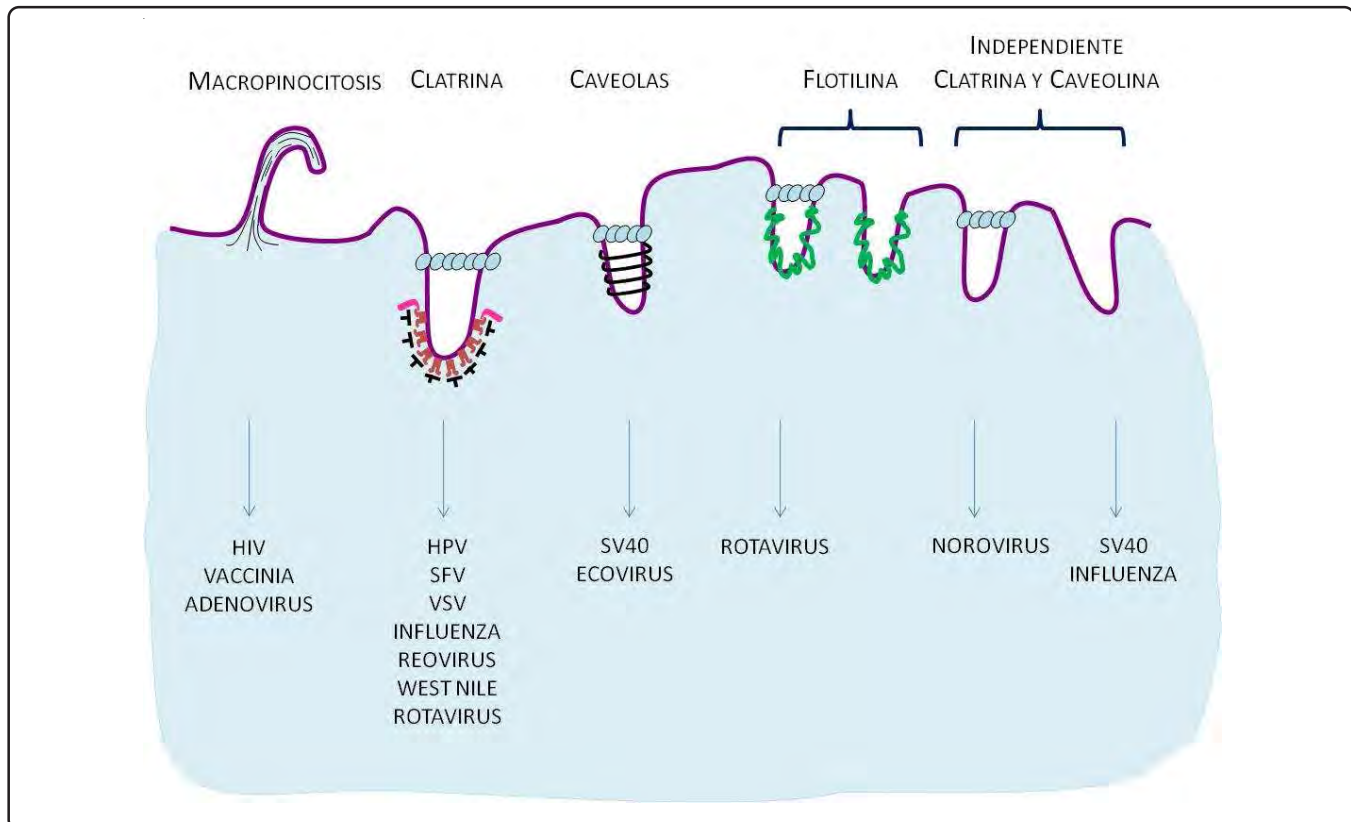


Figura 3. Se muestran las distintas vías de endocitosis y los virus que utilizan cada una de éstas. Ejemplos de virus que entran por macropinocitosis son: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), vaccinia y algunos serotipos de adenovirus. Dentro de los virus que entran por una vía dependiente de clatrina están: VPH (virus del papiloma humano), VSV (virus de la estomatitis vesicular), reovirus, influenza y algunas cepas de rotavirus. SV40 (virus de simio que produce vacuolas 40) y ecovirus son representantes de la endocitosis mediada por caveolas, mientras que la cepa de simio RRV de rotavirus entra a la célula por una vía independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina. Recientemente, se encontró que norovirus usa una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina. Finalmente, se ha reportado que influenza y SV40 también utilizan una vía independiente de clatrina, caveolina y dinamina.

directa (Figura 3). Cabe señalar que la jornada de un virus no termina cuando llega al interior de la célula, a partir de ese momento, la partícula viral requiere desnudarse, es decir, liberar el genoma viral para que pueda ser replicado o traducido. Finalmente, las proteínas virales se ensamblan para generar nuevas partículas virales que salen de la célula y son capaces de infectar a otras células.

En esta revisión nos enfocaremos a la entrada viral que es la primera etapa del ciclo replicativo de un virus. Específicamente, nos referiremos a las distintas rutas endocíticas que utilizan los virus para ingresar a la célula. Esta fase inicia desde que el virus se une a sus receptores celulares hasta que llega a su sitio de replicación, el cual puede ser desde el citoplasma hasta el núcleo. Este proceso involucra varios pasos (unión, penetración y desnudamiento de la partícula viral) y en el que es necesaria una cápside metaestable que, por un lado, sea resistente para sobrevivir en ambientes extracelulares y que, por otro lado, sea fácil de desensamblarse una vez llegado al sitio apropiado de replicación para liberar su material genético.

La entrada de un virus utilizando el proceso endocítico de la célula le da varias ventajas. Primero, evita la barrera del citoesqueleto de actina cortical que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana plasmática y forma una malla difícil de atravesar. Y por otra parte, le da acceso a los organelos endocíticos los cuales proveen de micro-ambientes que favorecen la penetración viral. Las proteasas endosomales o el bajo pH de estos organelos son algunos de los recursos más usados por los virus para facilitar procesos tales como el desnudamiento de la partícula.

¿Cómo se puede estudiar la entrada de los virus?

Es posible ver directamente a los virus mediante el microscopio electrónico o a través de microscopía de fluorescencia y se puede evaluar el papel de la inhibición de alguna vía de endocitosis en particular sobre la entrada del virus. Es factible marcar la envoltura, las proteínas o el genoma viral con compuestos fluorescentes lo que permite seguir a los virus así marcados durante su entrada en células vivas. Sin embargo, uno de los problemas que hay con este tipo de enfoque es que no es posible distinguir cuáles de las

partículas virales que entran a la célula son infecciosas y, por lo tanto, dan una infección productiva y cuáles no son infecciosas, por lo que no llevan a cabo una infección productiva. Éste no es un problema menor, ya que normalmente hay un gran número de partículas virales que no son "funcionales", este número puede llegar a ser como de 1:100 ó 1:10,000 donde hay una partícula infecciosa por cada cien o hasta diez mil partículas que son defectuosas. Al observar estas partículas por microscopía no es posible distinguirlas y, por consiguiente, no es posible determinar sólo con este método la vía de entrada productiva que utiliza un determinado virus.

Otra manera que permite evitar este problema es evaluar el efecto que tienen los inhibidores de endocitosis sobre la producción de proteína viral o sobre la replicación del genoma viral. Éste es el enfoque más usado en virus cuya proporción de partículas físicas *versus* infecciosas es alta, ya que permite estar más seguro de que se está determinando la vía de endocitosis que usan las partículas infecciosas.

Existen varios ejemplos de virus que utilizan las diferentes rutas de endocitosis para ingresar a la célula y a continuación daremos una breve descripción de los ejemplos más conocidos.

Endocitosis mediada por clatrina: mecanismo muy socorrido por los virus

La endocitosis mediada por clatrina es uno de los mecanismos más utilizados entre los virus (Figura 3). Esta vía es utilizada por virus de diferentes familias como son el virus de la estomatitis vesicular, papilomavirus y el virus del Nilo, entre otros²⁰⁻²². Virus de gran impacto médico como son el de influenza o el del dengue también entran a la célula por este mecanismo^{23,24}. En general, las moléculas -incluidos los virus- que entran a la célula por endocitosis mediada por clatrina están expuestas al ambiente ácido de los endosomas y pueden responder al bajo pH sufriendo cambios conformacionales. En el caso de los virus, estos cambios conformacionales permiten la exposición de péptidos de fusión los cuales a su vez interactúan con la membrana del endosoma facilitando su liberación al citosol. Dependiendo del pH que se requiera para provocar el cambio conformacional, el sitio de penetración de los virus puede ser los endosomas tempranos (que tienen un pH 6.5 a 6.0), tardíos (pH 6.0 a 5.5) e inclusive los lisosomas (pH 5.5 a 4). Un ejemplo de un virus que sufre una fusión catalizada por un ambiente ácido es el virus de influenza. En la superficie celular, el virus se une a receptores que tienen ácido siálico a través de las cabezas globulares de la glicoproteína viral hemaglutinina (HA). El virus es entonces internalizado vía la endocitosis mediada por clatrina y el bajo pH de los endosomas tardíos provoca cambios conformacionales en las cabezas globulares de la proteína HA. Esto expone al péptido de fusión el cual es una región altamente hidrofóbica de la proteína. Además, estos cambios lo acercan a la membrana del endosoma con lo cual la fusión de la membrana viral con la endosomal se puede llevar a cabo y el genoma viral es liberado

al citoplasma. Si los cambios conformacionales se inducen antes de que el virus sea internalizado, mediante un tratamiento de las partículas virales con pH ácido, por ejemplo, el virus se inactiva y pierde su infectividad²⁵.

Por otro lado, en algunos casos el pH ácido no es suficiente para inducir algún cambio conformacional necesario para facilitar la fusión de la partícula viral con el endosoma. Se ha reportado que algunos virus son activados a través de cortes proteolíticos que son llevados a cabo por proteasas endosomales, como las catepsinas (que son proteasas cuya actividad depende de pH). En este caso el pH endosomal es necesario para activar a la proteasa endosomal que al cortar alguna proteína viral promueve el cambio conformacional de la partícula viral, lo que favorece a su vez la penetración al citoplasma celular^{26,27}.

Endocitosis mediada por caveolas

Existen varios virus que pueden entrar por la ruta dependiente de caveolina como son el virus de la leucemia murina, ecovirus y SV40, entre otros (Figura 3)²⁸⁻³⁰.

En el caso de SV40, un virus de DNA que tiene el potencial de causar tumores, su infectividad se ve disminuida cuando se trata a las células con drogas como la nistatina, que inhiben esta vía²⁸. Asimismo, la expresión de una mutante dominante negativa de dinamina (defectuosa en su actividad de GTPasa) inhibe la entrada de este virus⁸, lo que sugiere que SV40 entra a la célula por una vía dependiente de caveolina y dinamina. Continuando la caracterización de la vía de entrada, Pelkmans *et al.*, demostraron que inhibidores de tirosín cinasas como la genisteína bloquean la internalización de este virus⁸. Además, SV40 requiere un citoesqueleto de actina dinámico dado que inhibidores de la polimerización de actina afectan su infectividad⁸. La ruta de entrada de SV40 es bastante inusual, este virus después de ser internalizado por la vía dependiente de las caveolas es llevado a organelos celulares neutros llamados caveosomas (Figura 1) y de ahí es transportado al retículo endoplasmático donde la partícula viral es desensamblada por enzimas de la maquinaria del plegamiento de proteínas^{31,32}. Al ser un virus de DNA, el sitio de replicación de este virus es el núcleo de la célula. Aún se desconoce el mecanismo que utiliza este virus para llegar hasta este organelo.

Macropinocitosis

Recientemente, Mercer *et al.*, encontraron que vaccinia, un virus de DNA envuelto que es responsable de la viruela en las vacas y que se replica en el citosol, entra por macropinocitosis (Figura 3). En este trabajo, siguieron la entrada de vaccinia usando tanto partículas virales como proteínas celulares marcadas con fluoróforos y mostraron que este virus se asocia a filopodios, estructuras tipo dedo formadas por el citoesqueleto de actina que se proyectan del cuerpo de la célula. Siguiendo el paso de vaccinia, los autores vieron que este virus utiliza este tipo de estructuras para acercarse al

cuerpo de la célula y una vez en la membrana plasmática, el virus es literalmente engullido. Inhibidores del citoesqueleto de actina, tratamientos con amilorida que es un inhibidor de los intercambiadores Na^+/H^+ y mutantes dominantes negativas de Rac1 y PAK1 reducen la infección¹⁴.

Otros virus como adenovirus, virus de DNA no envueltos que infectan principalmente las vías respiratorias, también utilizan la macropinocitosis para entrar a la célula. La unión de estos virus a su receptor activa Rac1, además, microscopías electrónicas muestran que el virus se asocia a vacuolas grandes y sin cubierta. Inhibidores del citoesqueleto de actina y de los intercambiadores Na^+/H^+ bloquean la infección; el virus también activa CtBP1 para cerrar los macropinosomas con adenovirus en ellos³³. En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus envuelto con genoma de RNA, se ha reportado que entra por diferentes vías dependiendo del tipo de célula. Sin embargo, la macropinocitosis ha sido sugerida como su mecanismo de entrada en los macrófagos humanos³⁴. Esta observación se sustenta en la presencia del virus detectada por microscopía electrónica en macropinosomas y la inhibición de su entrada por drogas que evitan la formación de ruffles (extensiones de membrana generadas por la remodelación del citoesqueleto de actina), tales como amilorida³⁴.

Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

En el caso de virus internalizados por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de dinamina se encuentra rotavirus, un virus causante de diarrea severa en niños menores de 2 años. Este virus no envuelto está formado por tres capas concéntricas de proteína. La capa más externa tiene un papel muy importante en la infectividad viral, ya que está involucrada tanto en la unión como en la entrada de rotavirus.

Para entrar a la célula, los rotavirus requieren de varios pasos³⁵. El primero, es su activación por tripsina. Una vez activado, el virus se une a la célula blanco a través del reconocimiento de receptores presentes en la superficie celular. La presencia de dichos receptores determina en gran medida qué tipo celular puede infectar un virus. Se sabe que para los rotavirus, el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha x \beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ y la proteína de choque térmico Hsc70 están involucradas como sus receptores³⁵. En la entrada de rotavirus a la célula se ha sugerido la participación de los microdominios lipídicos (también conocidos como balsas lipídicas), ya que hay una severa disminución en la infectividad al remover el colesterol de la membrana (lo que resulta en la desestabilización de las balsas lipídicas)^{36,37}. La presencia de las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$, de la proteína Hsc70, así como de las partículas virales infecciosas en balsas lipídicas, apoyan la idea de que éstas son importantes en la entrada de rotavirus³⁸. Con respecto al mecanismo de entrada, se ha demostrado mediante el uso de drogas y de dominantes negativas (de eps15, caveolina-1 y dinamina-2), que la entrada de la cepa de rotavirus RRV es independiente tanto de la endocitosis mediada por

clatrina como la de caveolina y, sin embargo, depende de dinamina, una proteína involucrada en la liberación de la vesícula de la membrana plasmática³⁷. Estudios recientes sugieren que esta cepa de rotavirus pudiera estar utilizando una vía dependiente de flotilina y dinamina para entrar (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar).

A inicios de este año, se reportó que el norovirus murino 1, un virus causante de gastroenteritis, entra por una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina (Figura 3)³⁹. Mediante el uso de agentes químicos y mutantes dominantes negativas también fue excluida la macropinocitosis como mecanismo de entrada para este virus.

Los virus pueden entrar a la célula utilizando diferentes rutas

Inicialmente se pensó que cada familia de virus utilizaba una sola vía de entrada para infectar diferentes tipos celulares. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que un mismo tipo de virus puede entrar por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular^{40,41}.

Como se mencionó anteriormente, el representante típico de la endocitosis mediada por clatrina es el virus de influenza²⁴. Sin embargo, se ha encontrado que en células HeLa este virus no es afectado por drogas o mutantes dominantes negativas que inhiben tanto las vías de endocitosis mediadas por clatrina, como las mediadas por caveolina, sugiriendo que influenza puede entrar también por una vía independiente de clatrina y dinamina (Figura 3)⁴¹. Virus que entran por endocitosis mediada por caveolas como SV40 también pueden tener otras vías de entrada³¹. En el 2005, Damm *et al.*, demostraron que este virus puede entrar en células sin caveolina y utilizar una vía que es independiente tanto de caveolina como de clatrina y de dinamina (Figura 3)⁴⁰. A pesar de utilizar diferentes mecanismos de endocitosis para ser internalizado, SV40 mantiene su dependencia por el colesterol y el requerimiento por las cinasas de tirosina en ambas vías de entrada^{31,40}.

Por otro lado, se ha encontrado que cepas de rotavirus que presentan diferentes requerimientos por los receptores de membrana podrían entrar por distintas vías endocíticas (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar). En este trabajo, se evaluó el papel de las vías de endocitosis mejor caracterizadas (la dependiente de clatrina, de caveolina y la macropinocitosis) en la entrada de varias cepas mediante el uso de agentes químicos, siRNAs y mutantes dominantes negativas. Además, se determinó la dependencia del proceso de entrada por el pH endosomal. Los resultados obtenidos muestran que sin importar las interacciones con los receptores, las cepas pueden entrar por vías distintas entre ellas la endocitosis mediada por clatrina y/o la dependiente de flotilina (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar).

CONCLUSIONES

Debido a su tamaño (que puede ser 100,000 veces más pequeño que una célula), los virus dependen de toda la maquinaria celular para su replicación y, por lo tanto, han desarrollado estrategias para aprovechar al máximo los recursos de su huésped. Es por esto que la caracterización del ciclo replicativo de los virus representa una fuente de conocimiento sin precedentes.

A través de la caracterización de las rutas de entrada de los virus, éstos han contribuido enormemente a la comprensión del funcionamiento de la célula. Varias de las vías de endocitosis aquí descritas se descubrieron gracias al estudio de los mecanismos de entrada utilizados por los virus. Detalles de la formación de las vesículas cubiertas por clatrina han sido descubiertos usando virus como reovirus, influenza y dengue^{23,24,42}.

En sí mismos estos agentes infecciosos son fascinantes pero a la vez, su alta adaptabilidad y especificidad por el tipo celular que infectan, los hacen una herramienta molecular muy útil.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por las becas 55005515 del Instituto Médico Howard Hughes, IN210807 de DGAPA-UNAM, y la 60025 de CONACyT. Michelle Gutiérrez es becaria de CONACyT.

REFERENCIAS

1. Mayor, S. & Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603-612 (2007).
2. Marsh, M. & Helenius, A. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**, 729-740 (2006).
3. Royle, S.J. The cellular functions of clathrin. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1823-1832 (2006).
4. Traub, L.M. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 583-596 (2009).
5. Takei, K. & Haucke, V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* **11**, 385-391 (2001).
6. Krajewska, W.M. & Maslowska, I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol. Biol. Lett.* **9**, 195-220 (2004).
7. Pelkmans, L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 295-304 (2005).
8. Pelkmans, L., Puntener, D., & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-539 (2002).
9. Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510-520 (2009).
10. Kerr, M.C. & Teasdale, R.D. Defining macropinocytosis. *Traffic*. **10**, 364-371 (2009).
11. Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.V., & Simons, M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 3189-3199 (2004).
12. Liberali, P. *et al.* The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* **27**, 970-981 (2008).
13. Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**, 547-563 (2010).
14. Mercer, J. & Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535 (2008).
15. Lamaze, C. *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7**, 661-671 (2001).
16. Sauvonnnet, N., Dujeancourt, A., & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammacytokine receptor. *J. Cell Biol.* **168**, 155-163 (2005).
17. Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., & Mayor, S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell* **2**, 411-423 (2002).
18. Glebov, O.O., Bright, N.A., & Nichols, B.J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 46-54 (2006).
19. Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., & Zhuang, X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic*. **8**, 389-401 (2007).
20. Chu, J.J. & Ng, M.L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* **78**, 10543-10555 (2004).
21. Day, P.M., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1-11 (2003).
22. Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., & Whittaker, G.R. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**, 53-60 (2005).
23. Van der Schaar, H.M. *et al.* Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* **4**, e1000244 (2008).
24. Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., & Zhuang, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 567-573 (2004).
25. Puri, A., Booy, F.P., Doms, R.W., White, J.M., & Blumenthal, R. Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. *J. Virol.* **64**, 3824-3832 (1990).
26. Chandran, K., Sullivan, N.J., Felbor, U., Whelan, S.P., & Cunningham, J.M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643-1645 (2005).
27. Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., & Dermody, T.S. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 24609-24617 (2002).
28. Anderson, H.A., Chen, Y., & Norkin, L.C. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1825-1834 (1996).
29. Beer, C., Andersen, D.S., Rojek, A., & Pedersen, L. Caveola-dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* **79**, 10776-10787 (2005).
30. Marjomaki, V. *et al.* Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* **76**, 1856-1865 (2002).
31. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**, 473-483 (2001).

32. Schelhaas, M. *et al.* Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* **131**, 516-529 (2007).
33. Amstutz, B. *et al.* Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* **27**, 956-969 (2008).
34. Marechal, V. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* **75**, 11166-11177 (2001).
35. Isa, P., Gutiérrez, M., Arias, C.F., & López, S. Rotavirus cell entry. *Future Virology* **3**, 135-146 (2008).
36. Guerrero, C.A., Zarate, S., Corkidi, G., López, S., & Arias, C.F. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**, 9362-9371 (2000).
37. Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F., & López, S. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**, 2310-2318 (2004).
38. Isa, P., Realpe, M., Romero, P., López, S., & Arias, C.F. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**, 370-381 (2004).
39. Perry, J.W. & Wobus, C.E. Endocytosis of Murine Norovirus 1 (MNV-1) into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J. Virol.* (2010).
40. Damm, E.M. *et al.* Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**, 477-488 (2005).
41. Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **76**, 10455-10464 (2002).
42. Ehrlich, M. *et al.* Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605 (2004).
43. Blanchard, E. *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964-6972 (2006).
44. Maruoka, N. *et al.* Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: A dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**, 178-186 (2007).
45. Hansen, S.H., Sandvig, K., & van Deurs, B. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* **121**, 61-72 (1993).
46. Heuser, J.E. & Anderson, R.G. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**, 389-400 (1989).
47. Judah, J.D., Howell, K.E., Taylor, J.A., & Quinn, P.S. Potassium depletion inhibits the intracellular transport of secretory proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **92** (Pt 2), 173-185 (1989).
48. Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., & Dautry-Varsat, A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 9), 1303-1311 (1999).
49. Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N., & Robinson, M.S. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**, 909-918 (2003).
50. Subtil, A. *et al.* Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6775-6780 (1999).
51. Trouet, D., Hermans, D., Droogmans, G., Nilius, B., & Eggermont, J. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 461-465 (2001).
52. Peterson, J.R. & Mitchison, T.J. Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* **9**, 1275-1285 (2002).
53. Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R., & Bubb, M.R. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 18-37 (1999).
54. Misinzo, G. *et al.* Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* **86**, 2057-2068 (2005).
55. García, M.L. *et al.* Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 3763-3771 (1990).
56. Genth, H., Dreger, S.C., Huelsenbeck, J., & Just, I. Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 592-597 (2008).

Rotavirus cell entry

**Pavel Isa,
Michelle Gutiérrez,
Carlos F Arias &
Susana López†**

†Author for correspondence
UNAM, Instituto de
Biotecnología,
Avenida Universidad 2001,
Colonia Chamilpa,
Cuernavaca, Morelos
62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1615;
Fax: +52 777 317 2388;
susana@ibt.unam.mx

The initial steps of viral infection involve the specific attachment of the viral particle to receptor(s) on the cell surface, followed by internalization of the virus into the cell and the subsequent uncoating of the virion to release the transcriptionally active particle. These events are essential for the successful initiation of a virus replication cycle and play an important role in tissue tropism and pathogenesis of viruses. Rotaviruses, the leading cause of severe childhood diarrhea, principally infect the mature enterocytes of the villi of the small intestine. Several cell-surface molecules have been implicated in the early interactions of rotavirus with its host cell, including sialic acid, various integrins, heat shock protein 70 and gangliosides. However, the mechanism by which rotaviruses enter cells is controversial, and both direct membrane penetration and endocytosis have been proposed. Recently developed molecular and biochemical tools have allowed the characterization of new endocytic pathways in mammalian cells. The description of these new pathways led us to review and discuss the available data on rotavirus cell entry.

Rotaviruses are the leading etiologic agents of severe diarrheal disease in infants and young children, being responsible for an estimated incidence of 600,000 annual deaths globally, and placing a significant economic burden on the global healthcare system [1]. Two live-attenuated vaccines have recently been licensed, however, previous experience with the first licensed rotavirus vaccine, which after being released in 1998 was withdrawn from the market a year later owing to a possible correlation between vaccine application and the occurrence of intussusception [2,3], has reinforced the need to develop alternative approaches to control rotavirus infection. Fundamental to these developments is a deep understanding of the molecular basis by which rotaviruses enter their host cells.

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are nonenveloped viruses, 100 nm in diameter, with a genome composed of 11 segments of dsRNA. The genome is enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. The innermost layer, formed by viral protein (VP)2, contains the viral genome and small amounts of the viral RNA polymerase VP1 and the guanylyl-transferase VP3; these viral elements constitute the core of the virus. The addition of VP6 on top of the core produces double-layered particles (DLPs). The outermost layer, present in infectious triple-layered particles (TLPs), is composed of two proteins, VP4 and VP7. The smooth external surface of the virus is formed by glycoprotein VP7, while the spike-like structures consist of VP4 [4]. VP4 and VP7 are responsible for

the initial interactions of the viral particle with the host-cell receptors and these proteins are also involved in the steps that lead to virus entry [5]. After binding to the cell surface, the virus must penetrate the plasma membrane to effectively infect the cell. This penetration is increased by, and most probably depends on, trypsin treatment of the virus, which results in the specific cleavage of VP4 into polypeptides VP8 and VP5 [4,6].

There has been great progress in the identification and characterization of rotavirus receptors in recent years (Table 1). Readers are encouraged to read some of the extensive reviews on the subject [5,7], since only a basic description of these receptors will be presented here. It has been proposed that rotavirus cell entry is a multistep process, which involves the two virus surface proteins and several cellular molecules, including sialic acids (SAs), integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha x\beta 2$, the heat shock cognate protein (hsc)70, and some gangliosides (reviewed in [5,7,8]). Differing sensitivity of rotavirus strains to treatment of cells with neuraminidase (NA; enzyme that removes the external SA from glycoproteins and gangliosides), led to the initial classification of rotaviruses into NA-sensitive and NA-resistant strains [9,10]. More recently, the characterization of viral strains whose infectivity is not inhibited by anti-integrin antibodies suggested the existence of rotavirus strains that are integrin independent [11]. The participation of various cell-surface molecules during rotavirus cell entry suggests that in this process the surface capsid proteins interact sequentially with several of these molecules [5],

Keywords: caveolin, clathrin, conformational change, direct penetration, endocytosis, gangliosides, integrins, membrane lipid microdomains, rafts, rotavirus, sialic acid, virus entry

future part of **medicine** **fsg**

Table 1. Cell-surface molecules involved in rotavirus cell entry.

Surface molecule	Rotavirus strain*	Assay	Cell line	Ref.
Sialic acid	Several animal strains	Infectivity after neuraminidase treatment of cells	MA104	[8,9]
Murine enterocyte glycoproteins	RRV	VOPBA	-	[91]
Gangliosides	OSU, KUN, MO, NCDV, UK and SA11	Binding and infectivity assays Binding in TLC plates	MA104 CHO-Lec2	[8,92–94]
Integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ and $\alpha v\beta 3$	Several strains	Infectivity assays; blocking with mAbs, ligands and peptides	MA104	[11,69,95–97]
Heat shock cognate protein 70	RRV, Wa and nar	Infectivity assays; blocking with mAbs and purified protein	MA104	[69,75,98]

*RRV and SA11 (simian origin); nar (neuraminidase-resistant mutant of RRV strain); OSU (porcine origin); KUN, MO and Wa (human origin); NCDV and UK (bovine origin).

mAb: Monoclonal antibody; TLC: Thin layer chromatography; VOPBA: Viral overlay protein blot assay.

and it is thought that these interactions cause conformational changes in the virus particles that may be crucial during cell membrane penetration [7,12]. The sequence of interaction events between the virus and the cell surface has been extensively characterized for the Simian rotavirus strain RRV (which is sensitive to NA) and the monkey kidney cell line MA104. Based on these studies, a model for the early interactions of rotavirus RRV with the host cell was suggested (reviewed in [5]). It has been proposed that the initial contact of the virus with the cell surface occurs through a SA-containing cell receptor, which uses the VP8 domain of VP4. This initial interaction of the virus with SA probably induces a subtle conformational change of VP4, which allows the virus to subsequently interact with integrin $\alpha 2\beta 1$ through VP5. After this second interaction, three more interactions take place, although their order of occurrence has not been established. These interactions occur between: VP5 and hsc70; VP7 and integrin $\alpha v\beta 3$; and VP7 and integrin $\alpha x\beta 2$. Independent of their order of occurrence, the various virus–receptor interactions most probably induce marked conformational changes in the viral proteins, which ultimately lead to the penetration and uncoating of the virus through a raft-mediated process.

Virus entry

While detailed information about the entry of several enveloped viruses is now available [13–15], the mechanism by which nonenveloped viruses enter cells is not well understood. Viral fusion proteins at the surface of enveloped viruses mediate apposition and fusion of the viral and cellular membranes, allowing the viral nucleocapsid to enter the cell. Whether this fusion event occurs at the cell surface or in an endosomal vesicle is

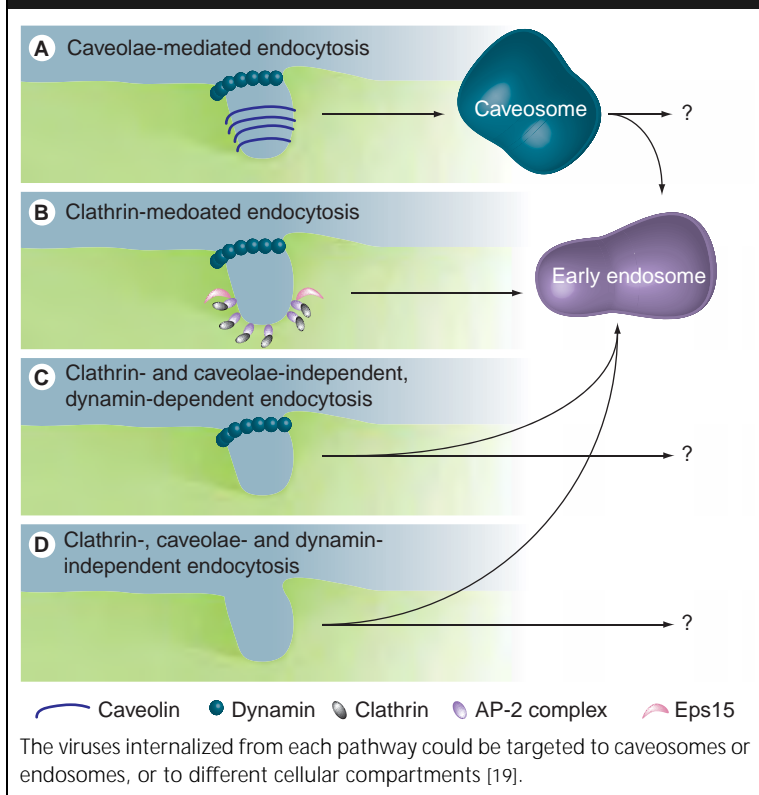
mostly determined by the optimum pH of the viral fusion protein [16–18]. The cell entry mechanism of nonenveloped viruses poses the problem that a large hydrophilic virus particle must traverse a lipid membrane without having the resource that enveloped viruses have, of fusing two lipid membranes. Two general mechanisms used by these viruses to reach the cell's cytoplasm have been described: direct penetration at the cell surface, during which the viral particles are directly translocated from the external milieu into the cytoplasm, or internalization into cellular compartments (e.g., endosomes).

The endocytic pathways used by different viruses include clathrin-mediated endocytosis, uptake via caveolae, macropinocytosis, and novel nonclathrin, noncaveolae pathways that have been recently described (Figure 1) [19,20]. The involvement of a particular virus entry pathway was initially based on the use of inhibitory drugs, which often have more than one target in the cell and thus provide limited information. Currently, more specific methods are available, such as the use of dominant-negative mutants, or inhibition of the expression of a specific protein by RNA interference. These techniques have become important tools to characterize the routes used by viruses to enter cells [19,20]. In light of the distinct endocytic pathways that have been recently described, it is important to critically reassess the previously published work on rotavirus entry.

Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity

In vivo, rotaviruses have a specific cell tropism, infecting primarily the mature enterocytes of the villi of the small intestine, which represents an environment with large amounts of proteolytic

Figure 1. Main endocytic pathways that viruses use to enter into the cell.



enzymes; therefore, it was not surprising to find that treatment of these viruses with trypsin results in the specific activation of their infectivity [21–24]. This activation is mediated by the cleavage of VP4 protein at three conserved arginine residues located at amino acid (aa) positions 231, 241 and 247, to yield polypeptides VP8 (aa 1–231) and VP5 (aa 248–776) [4,6,22]. The enhancement of infectivity of the Simian rotavirus strain SA11 4S correlates with cleavage at Arg 247, rather than at Arg 231 or 241 [6]. Cleavage must be in that precise aa since cleavage with other proteolytic enzymes, such as chymotrypsin, which cleaves at neighboring Asp 242 and Tyr 246, did not promote the enhancement of viral infectivity [6]. Further processing of VP5 at aa 259, 583 and possibly 467, was observed after additional trypsin treatment [25], although their relevance on the enhancement of infectivity is not clear. Trypsin cleavage of VP4 does not affect binding of the virus to the cell surface, but it is required for entry of the virus into the cell's cytoplasm, and probably for the uncoating of the virus particle. The mechanism through which the trypsin cleavage of VP4 enhances rotavirus infectivity is not known, although it has been suggested that

it primes the virus for entry by triggering a conformational change in the protein that rigidifies the VP4 spikes (see later) [25]. An alternative explanation is that peptides generated by the trypsin cleavage of VP4 activate the membrane-destabilizing properties of the viral outer capsid proteins [26–29].

Rotavirus cell entry

Rotavirus entry into polarized cells

Despite the fact that *in vivo* rotaviruses infect mature enterocytes, studies on the infection of these type of cells have been limited by the lack of established cell lines of small intestinal origin. The few reports of enterocyte infection have been carried out in cultures of jejunal mucosal explants of ponies, primary murine small intestinal epithelial cells and bovine fetal intestinal epithelial cells, all of which were shown to be susceptible to infection by homologous and heterologous rotavirus strains [30–32]. Cell entry by rotavirus has also been studied in polarized cell lines grown on permeable membrane filters, where it was found that NA-resistant rotavirus strains infected the apical and basolateral sides of the cells with similar efficiency, while the infection of NA-sensitive strains was restricted to the apical side, and this selective infection correlated with the expression of SA on the apical membranes of the cells [33].

As already mentioned, integrins play an important role as receptors for rotavirus infection [5]. However, in polarized epithelia integrins are localized at the basolateral side of cells [34,35], where they would not be accessible for interaction with the virus. It was recently reported that the VP8 domain of VP4 specifically and transiently opens up tight junctions (TJs) in polarized MDCK cell monolayers [36], augmenting the paracellular passage of nonionic tracers, and allowing the diffusion of the basolateral proteins Na⁺/K⁺-ATPase, α v β 3 integrin and β 1 integrin subunit, to the apical side of the cells. These changes correlated with an altered subcellular distribution of the TJ proteins ZO-1, claudin-3 and occludin, suggesting that the interaction of the virus with polarized epithelia could also alter the TJs, allowing the basolateral integrins to diffuse to the apical domain of the cells, where they could interact with the viral particles.

Rotavirus entry into nonpolarized cells

Given the lack of a better model, most of the studies on the entry and replication cycle of rotavirus have been carried out either in the epithelial

monkey kidney cell line MA104 or in the human colon carcinoma cell line Caco-2, in which rotaviruses grow to high titers.

Early electron microscopy studies of rotavirus-infected cells described the presence of rotavirus particles in coated pits and in a variety of vesicles [37,38]. Using this technique, it was proposed that trypsin treated, infectious rotavirus particles enter cells by direct plasma membrane penetration, while the untreated, noninfectious viral particles are removed from the cell surface by endocytosis, a process that did not lead to a productive infection [39]. However, since electron microscopy studies are carried out with high multiplicities of infection, and virus preparations usually contain an excess of noninfectious particles, it is not possible to determine by this method alone whether individual events are part of a pathway leading to a productive infection.

The rate of cell entry by trypsin treated and nontreated simian rotavirus RRV was studied using an infection assay [40]; trypsin-activated virus was found to be internalized with a half-time of 3–5 min, while it took ten-times longer for the nonactivated virus to disappear from the cell surface. These results reinforce the idea that infectious rotavirus particles enter MA104 cells by direct membrane penetration, while noninfectious particles are internalized via a pathway that leads to a nonproductive infection. The direct penetration hypothesis was also supported by the fact that treatments known to affect the classical endocytic pathway did not seem to affect the infectivity of several different rotavirus strains (summarized in Table 2) [37,40–44]. Direct cell membrane penetration has also been proposed as a mechanism of entry of rotaviruses supported by the findings that purified trypsin-activated RRV

Table 2. Treatments that affect different steps in the cellular entry of rotaviruses.

Pathway affected	Inhibitors	Viral strain*	Cell line	Effect on infectivity	Ref.
Clathrin-mediated endocytosis	Chlorpromazine Sucrose Eps15 DN [‡]	RRV	MA104	None	[47]
Caveolae-mediated endocytosis	Nystatin, Filipin	RRV	MA104	None	[47,99]
	M β -cyclodextrin	RRV, Wa, nar	MA104	90% reduction	
	Caveolin-1 DN	RRV	MA104	None	
	Caveolin-3 DN	RRV			
Vesicle scission	Dynamin DN	RRV	MA104	85% reduction	[47]
Cytoskeleton polymerization	Cytochalasin D	RRV	MA104	None	[47]
			L929	Sixfold increase	[41]
	Colchicine	RRV	MA104 L929	None	
Energy inhibitors	Sodium azide	RRV	MA104 L929	None None	[40,41]
	Dinitrophenol	RRV	MA104	None	
Inhibitors of endosomal acidification	NH ₄ Cl	OSU, RRV, SA11, KUN	MA104 L929	None None [§]	[37,40,41,43,47,84] [42,44,47]
	Bafilomycin A1	RRV, OSU, OSU, SA11	MA104 MA104	60% reduction [§] None	[83] [37,40,41,43]
	Cloroquine	OSU, RRV, KUN, SA11	MA104 L929	None None	[41,84] [42,43,47]
	Methylamine	RRV, KUN	MA104	None	[43,84]
	Dansylcadaverine	RRV, KUN	MA104	None	[84]
	Monensin	SA11	MA104		
	Nigericin	SA11	MA104		
Increase in [Ca ²⁺] _i	Ionophore A23187	OSU	MA104	Inhibition [¶]	[37]
	Ionomycin	RRV	MA104	None [§]	[42]
	Thapsigargin	RRV	MA104	None [§]	[83]
	Ca-EGTA	OSU, SA11	MA104	40–50% reduction [§]	

*RRV and SA11 (simian origin); nar (neuraminidase-resistant mutant of RRV strain); WA and KUN (human origin); OSU (porcine origin).

[‡]Dominant-negative mutant.

[§]As measured by α -sarcin co-entry.

[¶]Inhibition of decapsidation.

virions mediated ^{51}Cr ium, ^{14}C holine and ^3H inositol release from prelabeled MA104 cells [40]. In addition, infectious rotavirus particles of bovine strain RF were found to permeabilize carboxyfluorescein preloaded vesicles [45], and purified VP5 protein was found to be responsible for this release [27]. However, in these experiments a vast excess of purified rotavirus particles were used in relation to lipid or membrane proteins, and therefore it is difficult to assess the biological significance of these observations given that, *in vivo*, the number of infectious units of rotavirus capable of establishing a productive infection is low [46]. Early membrane permeabilization was also observed during cell entry of RRV, OSU and RF strains, which allowed the co-entry of toxin α -sarcin, with maximum permeability observed with as little as ten infectious particles per cell [42,44].

More recently, the entry of rotaviruses in MA104 cells was re-evaluated using new molecular and biochemical tools (Table 2). Rotaviruses were shown to enter cells in the presence of compounds that inhibit clathrin-mediated endocytosis, as well as cells overexpressing a dominant-negative form of Eps15, a protein crucial for the assembly of clathrin coats. It was also found that treatment of cells with the cholesterol-binding agents nystatin and filipin, as well as the expression of dominant-negative caveolin-1 and -3 mutants, had no effect on rotavirus infection, suggesting that the virus was able to enter cells in which the caveolae uptake was blocked. Interestingly, cells expressing a dominant-negative mutant of the large GTPase dynamin, which is known to function in several membrane scission events, and cells treated with methyl- β -cyclodextrin, a drug that sequesters cholesterol from membranes, were poorly infected by rotavirus, indicating that cholesterol and dynamin play a role in the entry of these viruses [47]. Cholesterol is a key molecule involved in the integrity of membrane lipid microdomains known as 'lipid rafts' [48]. These structures have been shown to exist in cell membranes as a result of the differential affinity associations of lipids [49,50]. They are resistant to solubilization with mild detergents, and thus can be isolated as detergent-resistant membrane fractions by density centrifugation [51]. It was found that both the receptors for rotavirus and the infectious viral particle associate with detergent-resistant membrane early in infection [52], suggesting that lipid rafts play an important role during rotavirus cell entry, presumably by providing a platform that facilitates

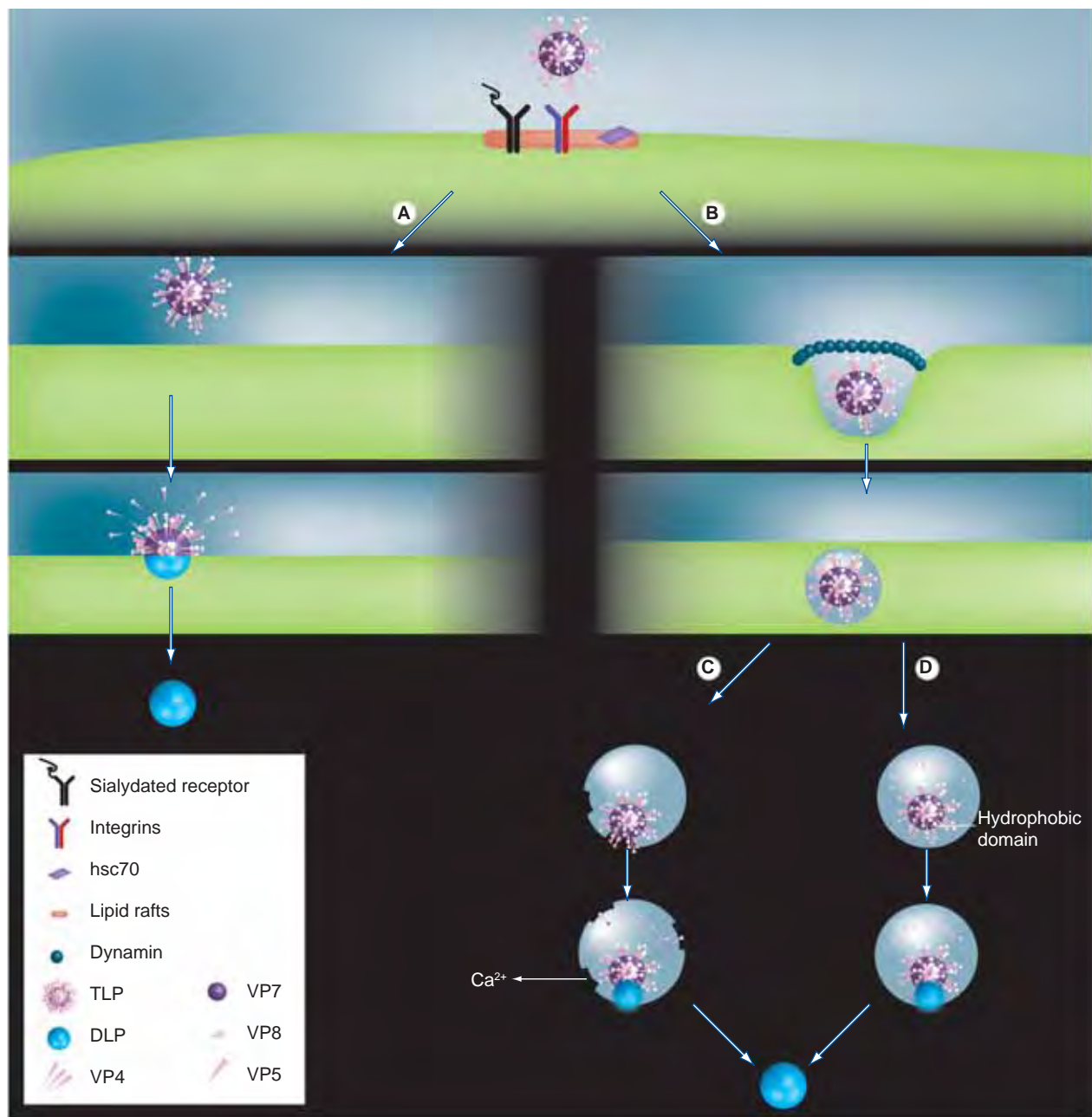
the efficient interaction of the cellular receptors with the viral particles. Interestingly, lipid rafts have also been found to be important during the morphogenetic process of rotaviruses [53–56]. Taken together, these results suggest that the entry of rotavirus RRV might use a recently described cell internalization pathway, referred to as caveolae/raft-dependent endocytosis, which is defined by its clathrin independence, dependence on dynamin and sensitivity to cholesterol depletion [57,58]. However, it can not be discarded that rotaviruses could enter the cell at the plasma membrane level, using an undefined, direct entry mechanism in which the depletion of cholesterol could either alter the fluidity of the membrane or disrupt the organization of the lipid rafts that might be holding together the rotavirus receptors, thus impairing virus entry (Figure 2).

Conformational changes

The initial binding of a virus to the cell is followed by a series of events that include changes to the structure of the virion. It has been shown that enveloped viruses frequently undergo conformational changes in their fusion glycoproteins following protease cleavage, and a secondary event that can include binding to a receptor and/or a pH change. These conformational changes are important in mediating the fusion of viral and cell membranes. Nonenveloped viruses, such as poliovirus, reovirus, or adenovirus have also been shown to undergo conformational changes upon interaction with their cell receptors [59–63]. In rotaviruses, it has been demonstrated that virus particles activated with trypsin become more hydrophobic [45]. It is possible that trypsin cleavage reorganizes the VP4 spikes into a conformation that will allow subsequent virus-receptor interactions; this hypothesis is based on recent studies demonstrating that, while the VP4 spikes of nontrypsinized particles of the Simian rotavirus strain SA11 4F could not be visualized by cryoelectron microscopy, these spikes became visible upon treatment of the virions with trypsin, indicating that the cleavage of VP4 yields icosahedrally ordered spikes, which are structurally different in trypsin cleaved and uncleaved virions [25].

As previously mentioned, during entry rotaviruses interact with several cell-surface molecules, including SA, gangliosides, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ and $\alpha v\beta 3$, and hsc70 [5,7]. Some of these receptors are used for virus attachment, while others appear to be involved in postattachment steps, and it has been proposed

Figure 2. Possible modes of rotavirus entry.



The interaction of rotavirus with its receptors induces conformational changes that allow the entry of the virus into the cell. The precise mechanism used by rotaviruses to enter the cell is not completely understood; however, recent findings point at two entry pathways. The first involves the direct penetration of rotavirus into the cell, resulting in the release of the DLP into the cytoplasm (A). The other possible route involves dynamin-dependent endocytosis, where the TLP particle is internalized in an endocytic vesicle (B). Once in this cellular compartment, distinct mechanisms may be involved to trigger the membrane penetration process. (C) A calcium-dependent mechanism, in which the virus uses an endocytic pathway that is sensitive to Ca^{2+} concentration [76]. In this model, the virus enters the cell by endocytosis and the vacuolar proton ATPase pump could provide the force for Ca^{2+} extrusion of the vesicle, lowering its concentration and favoring the solubilization of the viral outer capsid proteins, which in turn could permeabilize the endosomal membrane [75,76]. Once in the endocytic vesicle, the VP8 protein dissociates from the particle, exposing a hydrophobic domain on VP5, which could insert itself into the endocytic membrane, creating pores that could allow the viral particles to exit this vesicle (D).

DLP: Double-layered particle; hsc: Heat shock cognate protein; TLP: Triple-layered particle; VP: Viral protein.

that these sequential interactions might cause conformational changes in the viral particle that could eventually lead to the virus penetrating the membrane and uncoating, similar to what occurs in adenovirus [61], or several members of the *Picornaviridae* family [64–66]. The evidence that supports the conformational changes of rotavirus proteins during virus entry are derived from several different observations. A single aa substitution in the SA-binding domain of VP8 causes a conformational change in the protein [67,68] that allows RRV and OSU mutant strains to directly interact with integrin $\alpha 2\beta 1$, surpassing the initial interaction with SA [69].

The determination of the crystal structure of a large fragment of VP5 revealed further possible conformational changes during rotavirus cell entry [12,70]. It was found that this part of the protein folds back on itself, changing its structure from a dimer to a trimer, resulting in the translocation of a potential membrane-interacting peptide from one end of the spike to the other. Based on these observations it was proposed that the structural changes in VP5 might lead to the release of VP8 from the viral particle, unmasking a hydrophobic VP5 domain, which could insert into the membrane, a process that resembles the conformational changes observed in the membrane fusion proteins of some enveloped viruses [71,72]. The interaction(s), or condition(s), that could trigger this conformational change in VP5 are not yet clear. Furthermore, one of the molecules involved in the postbinding steps of rotavirus cell entry is hsc70 [73]; this chaperone protein has been associated with the transport of proteins across cell membranes, binding to nascent polypeptides, with the dissociation of clathrin from clathrin coats [74]. The interaction of hsc70 with rotavirus RRV in solution resulted in subtle conformational changes on the viral outer capsid proteins, which resulted in a partial loss of infectivity, leaving open the possibility that interaction of the virus with the membrane-associated hsc70 might induce conformational changes in the viral proteins that favor virus entry [75], in a manner similar to other viruses [76–79].

Virus uncoating

During, or shortly after, cell entry, the infecting TLP uncoats, losing the two outer layer proteins to yield a DLP that is transcriptionally active. The transcriptase activity is observed in *in vitro* assays when the surface proteins VP4 and VP7 are removed from mature TLPs by treatment

with Ca^{2+} -chelating agents [80]. *In vivo* it is not clear whether the virus uncoats during the penetration step or once it has reached the cytoplasmic milieu. It has been suggested that the penetration of the virions into the cell's cytoplasm, which has a Ca^{2+} concentration several orders of magnitude lower than the extracellular media, might be the factor that triggers the uncoating of the virus and the activation of the viral transcriptase. The observation that increases in cytoplasmic Ca^{2+} concentration induced by ionophores inhibit the uncoating of the porcine strain OSU supports this hypothesis [37], however, similar treatments did not inhibit the infectivity of simian strain RRV (Table 2) [42]. One possible explanation for these discrepancies is that different rotavirus strains require different Ca^{2+} concentrations to maintain the stability of the outer surface proteins on the viral particle [81,82].

The inhibition of infectivity of rotavirus OSU after treatment with bafilomycin A1 (an inhibitor of the endosomal H^+ -ATPase), together with the ability of soluble outer capsid protein to permeabilize cell membranes (see above), led to the hypothesis that rotaviruses use an endocytic pathway that is sensitive to Ca^{2+} concentration [83]. In this model, it was proposed that the trypsin-activated virus enters the cell by clathrin-mediated endocytosis and, once in the endosome, the vacuolar proton ATPase pump could provide the force for Ca^{2+} extrusion of the endosome, lowering its concentration and favoring the solubilization of the viral outer capsid proteins, which in turn could permeabilize the endosomal membrane, releasing the DLP into the cytoplasm [26,83]. Even though this model seems plausible, some conflicting results need to be taken into account; as mentioned earlier, treatments which affect clathrin-mediated endocytosis have not been found to affect rotavirus cell entry [37,40,42,44,47,84] and, although bafilomycin A1 is considered to be a specific inhibitor of the vacuolar proton ATPase, it has recently been reported that it can also affect other cell functions, such as endocytic transport, trapping virtually all viruses in early endosomes [85,86]. Thus, the precise mechanism that triggers rotavirus uncoating remains to be clarified.

Conclusion

Rotavirus entry seems to require sequential interactions of the virus surface proteins with distinct cell-surface molecules, in an organized membrane microenvironment (rafts).

The mechanism of virus entry into the natural target cells (enterocytes) is still not known and, to date, the available information comes from studies on different cell lines. The proposed mechanisms for the entry of rotavirus into cells have changed with time, going from classical endocytosis, to direct membrane penetration, and finally to a poorly characterized type of endocytosis. It is important to point out that the rotavirus strains that have been used in these studies are generally isolates adapted to grow in cell culture, and their mode of entry may differ from wild-type viruses when infecting enterocytes. The differences in receptor usage reported for different rotavirus strains suggest that there could also be differences in the mechanisms of cell entry used by different isolates.

In summary, the cell entry of the best studied rotavirus strain, RRV, suggests that after the initial interaction with SA, the virus interacts with several other cell-surface receptors located in lipid rafts, which promotes some conformational changes in the surface proteins of the virus that leads to penetration of the viral protein into the cytoplasm. The entry of RRV might use a recently described cell internalization pathway

referred to as caveolae/raft-dependent endocytosis, which is defined by its clathrin independence, dependence on dynamin and sensitivity to cholesterol depletion [48]. It is not known how or when the outer capsid is lost, nor how the virus is released from the endosome, but conformational changes of the virus surface proteins and the low concentration of intracellular Ca^{2+} could be involved in this process.

Future perspective

During the last decade a number of rotavirus receptors have been identified, and the mechanism of cell entry for some rotavirus strains has been partially characterized. An approach that should improve our knowledge about this process, which is just starting to be considered, is the study of the signaling cascades triggered during rotavirus cell entry. A powerful technique that will be used for this purpose is the silencing of the expression of selected genes by RNA interference. This technology will also be used in the near future to identify the cellular proteins that are involved in rotavirus entry, as well as those involved in later steps of virus replication, through genome-wide screenings using siRNA

Executive summary

Rotavirus cell entry

- Rotaviruses, the most important cause of severe diarrhea in children, infect the mature enterocytes of the small intestine.
- Owing to the lack of enterocyte cell lines, most studies of rotavirus cell entry have been carried out in epithelial cell lines (MA104 and Caco-2 cells) where the virus replicates efficiently, although they are not natural targets of the virus.
- Even though huge progress in the characterization of rotavirus receptors has been made, the mechanism by which these viruses enter their host cell has not been completely elucidated, and most of the studies have ended up with negative results, providing evidence about how these viruses do not enter the cell.
- The entry of these viruses does not occur through clathrin- or caveolae-mediated endocytosis, and they depend neither on the acidification of endosomes, nor on cytoskeleton proteins.
- Rotaviruses require cleavage by trypsin to be infectious, and depend on the presence of cholesterol on the cell membrane and the activity of the large GTPase dynamin.

Conclusion

- Considering the cell entry of the best studied rotavirus strain, RRV, it seems that after the initial interaction of the virus particle with sialic acids, it interacts with several other receptors organized in lipid rafts in the cell membrane. During these interactions some conformational changes in the viral particle take place, which are then followed by a recently described cell internalization pathway, referred to as caveolae/raft-dependent endocytosis, defined by its clathrin independence, dependence on dynamin, and sensitivity to cholesterol depletion.
- It is not yet known how the outer capsid is lost and how the virus is released from the endosome, but conformational changes and low intracellular Ca^{2+} levels could be involved.

Future perspective

- The study of virus entry into mature enterocytes, the primary natural target cells, must be carried out.
- The recently available imaging and functional genomic tools will be of great help to define more clearly the cell entry of rotaviruses; the use of time-lapse imaging and single-particle tracking of fluorescently-labeled rotavirus particles in living cells, and the genome-wide screening of siRNA and microRNA libraries to silence most of the genes involved in rotavirus infection will provide insight into the mechanism of entry of these viruses.

or microRNA libraries designed to silence most cellular genes. RNA interference was recently used to identify the cellular kinases that are important in clathrin- and caveolae-dependent endocytosis [87].

Since most of the current knowledge on rotavirus cell entry has been obtained using model cell lines, it is important that future studies make a special effort to characterize rotavirus entry into mature enterocytes, the natural targets of the virus. In addition, new methods that are developing at great speed, such as time-lapse imaging and single-particle tracking in living cells (reviewed in [88]), which were recently used to analyze the cell entry of poliovirus and dengue virus [89,90], would be important to incorporate in future studies to follow the entry of infectious virus particles into cells. The use of these techniques will allow us to observe the cell entry of fluorescently-labeled single virus particles in real

time and their interactions with cellular proteins during this process. The knowledge generated by these new approaches should provide information that is relevant for the design of novel therapeutic measures against infection with these viruses.

Financial & competing interests disclosure

Work on rotavirus cell entry in our laboratories is supported by grants 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, 60025 from CONACyT and IN210807 from DGAPA/UNAM. MG is a recipient of a scholarship from the National Council for Science and Technology (Mexico). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 565–572 (2003).
- From the Centers for Disease Control and Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine – United States, 1998–1999. *JAMA* 282, 520–521 (1999).
- Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS *et al.*: Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 344, 564–572 (2001).
- Estes MK, Kapikian AZ: Rotaviruses. In: *Fields Virology*. Knipe NM, Howley PM (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, USA, 1917–1974 (2007).
- Lopez S, Arias CF: Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12, 271–278 (2004).
- **Describes the sequential interactions between rotaviruses and their cell membrane receptors.**
- Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S: Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70, 5832–5839 (1996).
- **Detailed analysis of the rotavirus–trypsin-activation pathway, describing the sequentiality of viral protein (VP)4 processing, and its correlation with the enhancement of viral infectivity.**
- Lopez S, Arias CF: Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 39–66 (2006).
- Isa P, Arias CF, Lopez S: Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27–37 (2006).
- Ciarlet M, Estes MK: Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80, 943–948 (1999).
- Ciarlet M, Ludert JE, Iturriza-Gomara M *et al.*: Initial interaction of rotavirus strains with *N*-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J. Virol.* 76, 4087–4095 (2002).
- Graham KL, Halasz P, Tan Y *et al.*: Integrin-using rotaviruses bind $\alpha 2\beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha \beta 2$ and $\alpha \beta 3$ by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77, 9969–9978 (2003).
- Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC: Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430, 1053–1058 (2004).
- **Determination of crystal structure of the main body of the VP4 spike, revealing a coil-coil stabilized trimer, and describing the possible reorganization of VP5 from dimer to trimer.**
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X: Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 567–573 (2004).
- Sun X, Yau VK, Briggs BJ, Whittaker GR: Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338, 53–60 (2005).
- Chu JJ, Ng ML: Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* 78, 10543–10555 (2004).
- Skehel JJ, Wiley DC: Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569 (2000).
- Sieczkarski SB, Whittaker GR: Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* 4, 333–343 (2003).
- Gibbons DL, Vaney MC, Roussel A *et al.*: Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* 427, 320–325 (2004).
- Mayor S, Pagano RE: Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612 (2007).
- **Reviews the recently described endocytosis pathways.**
- Sieczkarski SB, Whittaker GR: Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83, 1535–1545 (2002).
- Barnett BB, Spendlove RS, Clark ML: Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* 10, 111–113 (1979).

22. Espejo RT, Lopez S, Arias C: Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156–160 (1981).
23. Estes MK, Graham DY, Mason BB: Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39, 879–888 (1981).
24. Theil KW, Bohl EH, Agnes AG: Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). *Am. J. Vet. Res.* 38, 1765–1768 (1977).
25. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK *et al.*: Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J. Virol.* 75, 6052–6061 (2001).
- **Describes the differential conformations of VP4 spikes depending on trypsin processing; the spikes become rigid and visible by cryoelectron microscopy only after trypsin treatment of the virus.**
26. Ruiz MC, Abad MJ, Charpilienne A, Cohen J, Michelangeli F: Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J. Gen. Virol.* 78, 2883–2893 (1997).
27. Ruiz MC, Alonso TS, Charpilienne A *et al.*: Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J. Virol.* 68, 4009–4016 (1994).
28. Denisova E, Dowling W, LaMonica R *et al.*: Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes. *J. Virol.* 73, 3147–3153 (1999).
29. Charpilienne A, Abad MJ, Michelangeli F *et al.*: Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J. Gen. Virol.* 78, 1367–1371 (1997).
30. Buckner D, Wilson S, Kurk S, Hardy M, Miessner N, Jutila MA: Use of early passage fetal intestinal epithelial cells in semi-high-throughput screening assays: an approach to identify new innate immune system adjuvants. *J. Biomol. Screen.* 11, 664–671 (2006).
31. Batt RM, Embaye H, van de Waal S, Burgess D, Edwards GB, Hart CA: Application of organ culture of small intestine to the investigation of enterocyte damage by equine rotavirus. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20, 326–332 (1995).
32. Macartney KK, Baumgart DC, Carding SR, Brubaker JO, Offit PA: Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. *J. Virol.* 74, 5597–5603 (2000).
33. Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK: Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J. Virol.* 75, 11834–11850 (2001).
- **Describes differential infection of polarized cells depending on neuraminidase sensitivity of rotavirus strains.**
34. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25 (1992).
35. Gut A, Balda MS, Matter K: The cytoplasmic domains of a $\beta 1$ integrin mediate polarization in Madin–Darby canine kidney cells by selective basolateral stabilization. *J. Biol. Chem.* 273, 29381–29388 (1998).
36. Nava P, Lopez S, Arias CF, Islas S, Gonzalez-Mariscal L: The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 5509–5519 (2004).
- **Describes the capacity of rotavirus VP8 protein to open tight junctions in polarized epithelial cells, and its implications for rotavirus cell entry.**
37. Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J: Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 27, 95–101 (1987).
38. Quan CM, Doane FW: Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology* 20, 223–231 (1983).
39. Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, Ishida N: Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch. Virol.* 85, 25–34 (1985).
40. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB: Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62, 1136–1144 (1988).
41. Bass DM, Baylor M, Chen C, Upadhyayula U: Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology* 212, 429–437 (1995).
42. Cuadras MA, Arias CF, Lopez S: Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* 71, 9065–9074 (1997).
43. Fukuhara N, Yoshie O, Kitaoka S, Konno T, Ishida N: Evidence for endocytosis-independent infection by human rotavirus. *Arch. Virol.* 97, 93–99 (1987).
44. Liprandi F, Moros Z, Gerder M *et al.*: Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor α -sarcin. *Virology* 237, 430–438 (1997).
45. Nandi P, Charpilienne A, Cohen J: Interaction of rotavirus particles with liposomes. *J. Virol.* 66, 3363–3367 (1992).
46. Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM: Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.* 154, 871–880 (1986).
47. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S: Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78, 2310–2318 (2004).
- **Detailed analysis of cell entry by Simian rotavirus RRV by using different inhibitors and treatments, and expression of dominant-negative mutants important for different endocytic pathways.**
48. Simons K, Vaz WL: Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269–295 (2004).
49. Brown DA, Rose JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533–544 (1992).
50. Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK: Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148, 997–1008 (2000).
51. Manes S, del Real G, Martinez AC: Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 557–568 (2003).
52. Isa P, Realpe M, Romero P, Lopez S, Arias CF: Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 322, 370–381 (2004).
53. Broquet AH, Lenoir C, Gardet A *et al.*: Hsp70 negatively controls rotavirus protein bioavailability in Caco-2 cells infected by the rotavirus RF strain. *J. Virol.* 81, 1297–1304 (2007).
54. Cuadras MA, Greenberg HB: Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 313, 308–321 (2003).
55. Delmas O, Breton M, Sapin C, Le Bivic A, Colard O, Trugnan G: Heterogeneity of raft-type membrane microdomains associated with VP4, the rotavirus spike protein, in Caco-2 and MA 104 cells. *J. Virol.* 81, 1610–1618 (2007).

56. Delmas O, Durand-Schneider AM, Cohen J, Colard O, Trugnan G: Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized Caco-2 cells. *J. Virol.* 78, 10987–10994 (2004).
57. Nabi IR, Le PU: Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 161, 673–677 (2003).
58. Lajoie P, Nabi IR: Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell Mol. Med.* 11, 644–653 (2007).
59. Cavalli A, Prota AE, Stehle T *et al.*: A molecular dynamics study of reovirus attachment protein $\sigma 1$ reveals conformational changes in $\sigma 1$ structure. *Biophys J.* 86, 3423–3431 (2004).
60. Fernandes J, Tang D, Leone G, Lee PW: Binding of reovirus to receptor leads to conformational changes in viral capsid proteins that are reversible upon virus detachment. *J. Biol. Chem.* 269, 17043–17047 (1994).
61. Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF: The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J. Virol.* 74, 7085–7095 (2000).
62. Tosteson MT, Wang H, Naumov A, Chow M: Poliovirus binding to its receptor in lipid bilayers results in particle-specific, temperature-sensitive channels. *J. Gen. Virol.* 85, 1581–1589 (2004).
63. Tuthill TJ, Bubeck D, Rowlands DJ, Hogle JM: Characterization of early steps in the poliovirus infection process: receptor-decorated liposomes induce conversion of the virus to membrane-anchored entry-intermediate particles. *J. Virol.* 80, 172–180 (2006).
64. Hewat EA, Blaas D: Cryoelectron microscopy analysis of the structural changes associated with human rhinovirus type 14 uncoating. *J. Virol.* 78, 2935–2942 (2004).
65. Silberstein E, Xing L, van de Beek W, Lu J, Cheng H, Kaplan GG: Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin- and mucin-like regions. *J. Virol.* 77, 8765–8774 (2003).
66. Hogle JM: Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 677–702 (2002).
67. Mendez E, Arias CF, Lopez S: Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67, 5253–5259 (1993).
68. Ludert JE, Mason BB, Angel J *et al.*: Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 4), 725–729 (1998).
69. Zarate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, Lopez S: Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278, 50–54 (2000).
70. Yoder JD, Dormitzer PR: Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement. *EMBO J.* 25, 1559–1568 (2006).
- **Description of alternative, well-ordered dimers and trimers of VP5 protein, which facilitate the VP5 reorganization, thought to mediate membrane penetration during cell entry.**
71. Ruigrok RW, Aitken A, Calder LJ *et al.*: Studies on the structure of the influenza virus haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 69, 2785–2795 (1988).
72. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC: Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319 (2004).
73. Guerrero CA, Bouyssonade D, Zarate S *et al.*: Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76, 4096–4102 (2002).
74. Bukau B, Horwich AL: The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351–366 (1998).
75. Perez-Vargas J, Romero P, Lopez S, Arias CF: The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J. Virol.* 80, 3322–3331 (2006).
76. Jones PL, Korte T, Blumenthal R: Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 404–409 (1998).
77. Gilbert JM, Hernandez LD, Balliet JW, Bates P, White JM: Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 69, 7410–7415 (1995).
78. Belnap DM, Filman DJ, Trus BL *et al.*: Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J. Virol.* 74, 1342–1354 (2000).
79. Ivanovic T, Agosto MA, Chandran K, Nibert ML: A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly. *J. Biol. Chem.* 282, 12210–12219 (2007).
80. Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R: Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60, 177–182 (1979).
81. Gajardo R, Vende P, Poncet D, Cohen J: Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J. Virol.* 71, 2211–2216 (1997).
82. Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J: The concentration of Ca^{2+} that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J. Virol.* 70, 4877–4883 (1996).
83. Chemello ME, Aristimuno OC, Michelangeli F, Ruiz MC: Requirement for vacuolar H^{+} -ATPase activity and Ca^{2+} gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J. Virol.* 76, 13083–13087 (2002).
84. Keljo DJ, Kuhn M, Smith A: Acidification of endosomes is not important for the entry of rotavirus into the cell. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 257–263 (1988).
85. Drose S, Altendorf K: Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* 200, 1–8 (1997).
86. Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R: Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J. Virol.* 72, 9645–9655 (1998).
87. Pelkmans L, Fava E, Grabner H *et al.*: Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436, 78–86 (2005).
88. Brandenburg B, Zhuang X: Virus trafficking – learning from single-virus tracking. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 197–208 (2007).
- **Excellent review that points out the methodological possibilities that offer single virus particle tracking in living cells.**
89. Brandenburg B, Lee LY, Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, Hogle JM: Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol.* 5, e183 (2007).
90. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL *et al.*: Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J. Virol.* 81, 12019–12028 (2007).

91. Bass DM, Mackow ER, Greenberg HB: Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology* 183, 602–610 (1991).
92. Delorme C, Brussow H, Sidoti J *et al.*: Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol.* 75, 2276–2287 (2001).
93. Guo C, Nakagomi O, Mochizuki M *et al.*: Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem.* 126, 683–688 (1999).
94. Rolsma MD, Gelberg HB, Kuhlenschmidt MS: Assay for evaluation of rotavirus-cell interactions: identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates group A porcine rotavirus recognition. *J. Virol.* 68, 258–268 (1994).
95. Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E *et al.*: VLA-2 ($\alpha 2\beta 1$) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J. Virol.* 76, 1109–1123 (2002).
96. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ: Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 5389–5394 (1997).
97. Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF: Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 14644–14649 (2000).
98. Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R *et al.*: Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* 77, 7254–7260 (2003).
99. Guerrero CA, Zarate S, Corkidi G, Lopez S, Arias CF: Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74, 9362–9371 (2000).

Affiliations

- *Pavel Isa*
UNAM, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Tel.: +52 777 329 1612;
Fax: +52 777 317 2388;
pavel@ibt.unam.mx

- *Michelle Gutiérrez*
UNAM, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1612;
Fax: +52 777 317 2388;
mayret@ibt.unam.mx

- *Carlos F Arias*
UNAM, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1671;
Fax: +52 777 317 2399;
arias@ibt.unam.mx

- *Susana López*
UNAM, Instituto de Biotecnología, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
Tel.: +52 777 329 1615;
Fax: +52 777 317 2388;
susana@ibt.unam.mx

Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis[∇]

Michelle Gutiérrez, Pavel Isa, Claudia Sánchez-San Martín, Jimena Pérez-Vargas, Rafaela Espinosa, Carlos F. Arias, and Susana López*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210, México

Received 6 April 2010/Accepted 2 July 2010

Rotaviruses, the single most important agents of acute severe gastroenteritis in children, are nonenveloped viruses formed by a three-layered capsid that encloses a genome formed by 11 segments of double-stranded RNA. The mechanism of entry of these viruses into the host cell is not well understood. The best-studied strain, RRV, which is sensitive to neuraminidase (NA) treatment of the cells, uses integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$ and the heat shock protein hsc70 as receptors and enters MA104 cells through a non-clathrin-, non-caveolin-mediated pathway that depends on a functional dynamin and on the presence of cholesterol on the cell surface. In this work, using a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches, we compared the entry characteristics of four rotavirus strains known to have different receptor requirements. We chose four rotavirus strains that represent all phenotypic combinations of NA resistance or sensitivity and integrin dependence or independence. We found that even though all the strains share their requirements for hsc70, dynamin, and cholesterol, three of them differ from the simian strain RRV in the endocytic pathway used. The human strain Wa, porcine strain TFR-41, and bovine strain UK seem to enter the cell through clathrin-mediated endocytosis, since treatments that inhibit this pathway block their infectivity; consistent with this entry route, these strains were sensitive to changes in the endosomal pH. The inhibition of other endocytic mechanisms, such as macropinocytosis or caveola-mediated uptake, had no effect on the internalization of the rotavirus strains tested here.

Endocytosis is a cellular process that involves the formation of a vesicle whose cargo is transported from the extracellular milieu to the interior of the cell. Several endocytic pathways have been described, and all of them have been shown to be used by viruses during cell entry. These pathways include clathrin-mediated endocytosis, uptake via caveolae, macropinocytosis, phagocytosis, and a novel non-clathrin-, non-caveola-mediated pathway that is currently not well characterized (32). While detailed information about the entry of several enveloped viruses is now available (4, 35, 49, 53, 56), the mechanism by which nonenveloped viruses enter cells is not well understood. Two general mechanisms have been proposed to be used by these viruses to reach the cell's cytoplasm: direct penetration at the cell surface, during which the viral particles are directly translocated from the external milieu into the cytoplasm, or internalization through endocytic processes (55).

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are the leading etiologic agent of viral gastroenteritis in infants and young children worldwide, being responsible for an estimated 500,000 deaths each year (41). These nonenveloped viruses are formed by three concentric layers of protein that surround the viral genome, formed by 11 segments of double-stranded RNA. The outermost layer of the virion is formed by two proteins, VP4 and VP7, which are involved in the early interactions of the

virus with its host cell (7, 27). VP4 is involved in receptor binding and cell penetration. The role of VP7 is less clear, although it has been shown that it interacts with the cell surface molecules at a postattachment step (17). After binding to the cell surface, the virus penetrates the plasma membrane to productively infect the cell. This penetration depends on the trypsin treatment of the virus, which results in the specific cleavage of VP4 to polypeptides VP8 and VP5. This cleavage promotes VP4 rearrangements in the viral particles that rigidify the spikes (7, 11).

Despite the fact that, *in vivo*, rotaviruses primarily infect the mature enterocytes of the small intestine, studies of the infection of this type of cells have been limited due to the lack of established intestinal cell lines of small intestine origin. Given the absence of a better model, most of the studies on the entry and replication cycle of rotavirus have been conducted either in the epithelial monkey kidney cell line MA104 or in the human colon carcinoma cell line Caco-2, which are highly permissible to these viruses.

Using as a model MA104 cells and the simian rotavirus RRV, we have proposed that rotavirus cell entry is a complex multistep process that involves the two virus surface proteins and several cell receptors, including sialic acids, gangliosides, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, and $\alpha \chi\beta 2$, and the heat shock cognate protein hsc70 (22). We have also shown that depletion of cholesterol from the cellular membrane severely impairs the infectivity of rotavirus (19, 50) and have suggested that sphingolipid- and cholesterol-enriched membrane lipid microdomains might be involved in rotavirus cell entry, since the virus and its receptors associate with these domains at early times

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone: (52) (777) 3291615. Fax: (52) (777) 3172388. E-mail: susana@ibt.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 14 July 2010.

TABLE 1. Cellular receptor requirements of different rotavirus strains

Strain	Origin	Neuraminidase sensitivity	Integrin dependent	References
RRV	Simian	Yes	Yes	5, 6, 17
TFR-41	Porcine	Yes	No	6, 17
UK	Bovine	No	No	6, 17
Wa	Human	No	Yes	5, 17, 34

during infection (23). However, there are some rotavirus strains that may not use all these molecules; some rotavirus strains are resistant to the neuraminidase (NA) treatment of the cell, and thus, they have been classified as NA resistant (6, 34). Additionally, the infectivity of some viral strains is not blocked by anti-integrin antibodies, suggesting the existence of rotavirus strains that are integrin independent (Table 1) (17).

The precise mechanism utilized by rotavirus to enter the cell is, however, not yet defined. Recently, we reported that the entry of the simian rotavirus strain RRV is independent of clathrin- and caveola-mediated endocytosis; however, it is dependent on dynamin (a protein involved in the scission of the endocytic vesicles from the cellular membrane) and requires the presence of cholesterol in the cell membrane (50). In this work, using a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches, we compared the entry characteristics of four rotavirus strains known to have different receptor requirements. We found that all the strains tested share the requirement for hsc70, cholesterol, and dynamin. Unexpectedly, we found that there were differences in the type of endocytic route utilized by three of the strains compared to that of simian strain RRV. Bovine strain UK, porcine strain TFR-41, and human strain Wa more likely enter the cell through a clathrin-dependent mechanism, since treatments that inhibit this process block the infectivity of these rotavirus strains; in contrast, the entry of RRV, as previously shown (50), is independent of this pathway. The inhibition of other endocytic mechanisms, such as macropinocytosis or caveola-mediated uptake, had no effect on the entry of the rotavirus strains tested here.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in Advanced DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS) and was used for all experiments carried out in this work. Rhesus rotavirus strain RRV and the human strain Wa were obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), bovine rotavirus UK was donated by D. R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, United Kingdom), and porcine strain TFR-41 was obtained from I. Holmes (University of Melbourne, Victoria, Australia). All rotavirus strains were grown in MA104 cells as described previously (40). Double-layered rotavirus particles (DLPs) from different strains were purified by CsCl density gradient as reported previously (14). Reovirus type 1 was kindly provided by C. Ramos (CISEI, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico). Simian virus 40 (SV40) was obtained from L. Gutiérrez (National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico).

Antibodies and reagents. Monoclonal antibodies (MAbs) to clathrin heavy chain, hsc70, and hsp70 were purchased from ABR Antibodies (Golden, CO). MAbs against the large antigen of SV40 (anti-SV40 TAg) and antihemagglutinin (anti-HA) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Tetramethylrhodamine-conjugated dextran (TMR-dextran) and Alexa 488- and 568-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal

antibody was from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). Rabbit polyclonal antibodies to purified rotavirus particles (anti-TLPs), to rotavirus nonstructural protein (anti-NSP2), to reovirus, and to vimentin were produced in our laboratory. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), sucrose, bafilomycin A1, DMA [5-(*N,N*-dimethyl)amlioride hydrochloride], and water-soluble cholesterol (BioReagent product no. C4951) were purchased from Sigma (St. Louis, MO); ammonium chloride was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ).

Infectivity assay. Confluent MA104 cells in 96-well plates (for rotavirus infection) or 24-well plates (for SV40 infection) were washed twice with Eagle's minimum essential medium (MEM), and then approximately 2,000 focus-forming units (FFU) of rotavirus or reovirus or 6,000 FFU of SV40 were adsorbed to cells for 60 min at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, MEM was added, and the infection was left to proceed for 15 h for reovirus and rotavirus strains or 18 h for SV40 at 37°C. Infected cells were detected by an immunoperoxidase FFU assay using a rabbit hyperimmune serum directed to triple-layered particles (TLPs) (for RRV, UK, and TFR-41), a hyperimmune serum to rotavirus Wa, or a rabbit antireovirus antibody, as described previously (8). Briefly, cell monolayers were fixed with 80% acetone in phosphate-buffered saline (PBS), and intracellular viral antigen was detected by antirotavirus or antireovirus polyclonal antibodies followed by a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody as described earlier (8). The FFUs were counted in a VisiLab 1000 station (Biocom, Les Ulises, France) as reported previously (19). SV40-infected cells were detected by a fluorescence focus assay using an anti-SV40 TAg MAb as described previously (52).

Kinetics of rotavirus cell entry. To measure the rate of rotavirus cell entry, confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with cold MEM and left to chill on ice. Then, approximately 2,000 FFUs of each rotavirus strain were added per well, and the viruses were allowed to bind on ice for 1 h. After this time, unbound viruses were washed, warmed MEM was added, and the plates were placed over a 37°C water bath. At the time points indicated (see Fig. 1), the medium in the wells was aspirated, and viral particles still present on the cell surface were detached by two quick washes with 3 mM EGTA in PBS, followed by incubation in warm MEM. After reaching the last time point of the entry measurements (90 min), the 96-well plates were placed into a CO₂ incubator, and the infection was left to proceed for an additional 15 h. The cells were then fixed and stained as described above. The amount of virus that entered at each time point was compared to the amount of virus that entered when no EGTA wash was performed, which was taken as 100% entry.

Treatment of MA104 cells with inhibitors. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM and were pretreated or not with different concentrations (indicated in each figure) of M β CD and bafilomycin A1 (for 1 h), NH₄Cl and DMA (for 30 min), or sucrose (for 10 min); all reagents were dissolved in MEM. After this incubation, cells were infected with the different rotavirus strains or with reovirus (2,000 FFU per well) for 1 h, with the different reagents (except M β CD) maintained during this period. Cells were washed twice with 3 mM EGTA in PBS to remove viral particles still present on the cell surface. Reovirus-infected cells were further incubated with an antireovirus polyclonal antibody for 15 min to neutralize the virus that remained on the cell surface. Then, the infection was left to proceed for an additional 15 h. For cholesterol replenishment assays, cells were washed twice with MEM and treated for 1 h with M β CD 10 mM. After this treatment, the cells were washed twice with MEM, and water-soluble cholesterol (100 μ g/ml) was added for 1 h. The cells were washed again and were infected with rotavirus strains for 1 h. Finally, the cells were washed and the infection was left to proceed for 15 h; all incubations were performed at 37°C. After incubation, cells were fixed, stained, and analyzed as described above. None of these treatments caused cell death as determined by morphological examination and trypan blue exclusion assays (results not shown).

Dextran uptake. Confluent monolayers of MA104 cells grown on coverslips in 48-well plates were washed twice with MEM and treated with DMA for 30 min. Then, the cells were cooled for 10 min at 4°C. After this period, the cells were incubated with TMR-dextran (100 μ M) in the presence of DMA for 30 min at 4°C. Prewarmed MEM was added, and the cells were shifted to 37°C for 45 min. Finally, dextran uptake was stopped by washing with cold MEM and the cells were fixed and prepared for immunofluorescence as described below.

Blocking of rotavirus infectivity with monoclonal antibodies to hsc70. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM, and different concentrations of MAbs to hsc70 (MA3-006) or to hsp70 (MA3-009) were added to cells for 90 min at 37°C (18). After this incubation period, MAbs were removed and cells were infected with the different rotavirus strains (2,000 FFU per well) for 1 h at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, cells were washed twice with MEM, and the

infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as mentioned above.

Plasmids and transfections. Plasmids pCDNA3.1/Dyn2 (for wild-type [wt] dynamin), which expresses N-terminally HA-epitope-tagged dynamin, and pCDNA3.1/K44A (for mutant dynamin), expressing an N-terminally HA-epitope-tagged K44A mutant, were kindly provided by S. L. Schmid (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). pCINeo/IRES-GFP/caveolin-1 and pCINeo/IRES-GFP/caveolin-1 DN, which are bicistronic expression vectors expressing green fluorescent protein (GFP) and wild-type caveolin-1 or a mutant caveolin-1 from which residues 1 to 81 were deleted, respectively, were kindly donated by J. Eggermont, Katholieke Universiteit, Leuven, Belgium. Plasmids were transfected into 80% confluent cell monolayers grown on coverslips using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After 48 h, cells were infected with the different virus strains as described above. The expression of wt dynamin and the K44A mutant was monitored by using a MAb against the HA tag, whereas the expression of wt caveolin and its mutant was monitored through GFP expression.

Transfection of siRNAs. Clathrin heavy chain small interfering RNA (siRNA) was obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO); the sequence of this siRNA was previously reported (2, 38). The siRNA used to knock down the expression of dynamin-2 was kindly provided by P. Cossart (Pasteur Institute, Paris, France) (57). As an irrelevant control, an siRNA to green fluorescent protein was used. Transfection of siRNAs into MA104 cells was performed using a reverse transfection method. Briefly, 15 μ l Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) was diluted in 1 ml MEM and incubated for 10 min at room temperature. This mixture was then added to a well of a 48-well plate containing the siRNA, also diluted in MEM. After an incubation of 20 min at room temperature, 200 μ l of a single-cell suspension of 0.5×10^5 MA104 cells/ml was added to each well, and the cells were incubated at 37°C. Seventy-two hours later, the transfection mixture was removed and the cells were washed twice with MEM and infected with rotavirus.

Lipofection of DLPs. siRNA-transfected cells were transfected with DLPs from different rotavirus strains using Lipofectamine (lipofection). Briefly, DLPs were diluted in MEM and incubated with a mixture of Lipofectamine (Invitrogen Carlsbad, CA) in MEM for 20 min at room temperature. One hundred microliters of this mixture was added to the cells for 1 h at 37°C, and then cells were washed with MEM. At 15 h postlipofection, cells were fixed, and infected cells were detected by a peroxidase focus-forming assay as described above.

Immunofluorescence (IF) assay. MA104 cells grown on glass coverslips to approximately 80% confluence were transfected with plasmids for transient expression assays or with siRNAs as described above, and at 48 h posttransfection (for plasmids) or 72 h posttransfection (for siRNAs), cells were infected with rotavirus or reovirus for 2 h at 37°C. Six hours postinfection (h.p.i.), the cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min. After this time, the cells were washed three times with PBS containing 50 mM NH₄Cl, permeabilized by incubation with 0.5% Triton X-100 in blocking buffer (50 mM NH₄Cl, 1% bovine serum albumin [BSA] in PBS) for 15 min, washed three times with PBS containing 50 mM NH₄Cl, and blocked by incubation with 1% BSA, 50 mM NH₄Cl in PBS at 4°C overnight. The coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h, followed by incubation with the corresponding Alexa-labeled secondary antibodies for 1 h. All incubations were performed at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Fluokeep (Argene, Varilhès, France), and slides were analyzed with a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 2 mot plus) coupled to a digital camera (Photometrics Cool Snap HQ). The images were then digitally captured and prepared in Adobe Photoshop 6.0.

Immunoblot analysis. Cells were lysed in Laemmli sample buffer, denatured by boiling for 5 min, subjected to SDS-PAGE, and transferred to Immobilon NC (Millipore) membranes. Membranes were blocked with PBS containing 5% nonfat dry milk and incubated with the antibodies indicated in Fig. 7 as previously described (36). Bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody and the Western Lightning system (PerkinElmer).

Image analysis and statistical analysis. For quantification, nonmanipulated raw images were assessed and counted for infected/transfected cells. In all instances, data were acquired from at least three independent experiments. All statistical evaluations were carried out with the two-tailed paired *t* test using Prism 5.0.

RESULTS

Kinetics of entry of different rotavirus strains. To determine if receptor usage had some influence in the mechanism of

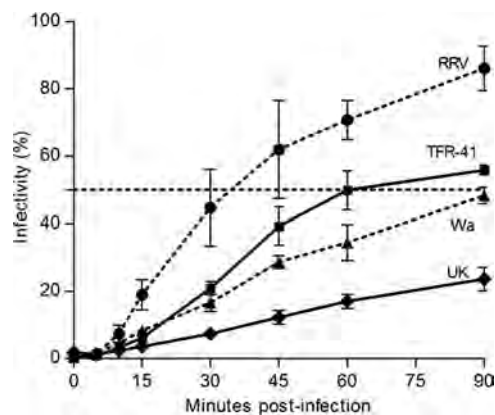


FIG. 1. Kinetics of rotavirus entry. MA104 cells grown in 96-well plates were infected with 2,000 FFUs of the indicated virus strains per well. Viral particles present at the cell surface were removed with 3 mM EGTA at the indicated time points, and the infection was allowed to proceed for 15 h at 37°C. Finally, cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity obtained in wells where viral particles of each strain were not removed with EGTA, which was taken as 100% infectivity. The arithmetic means and standard deviations of the results of three independent experiments performed in duplicate are shown.

rotavirus entry, we selected four rotavirus strains that have been shown to differ in their susceptibility to NA treatment of target cells and in their integrin dependence. Table 1 shows the four strains chosen for this study. As mentioned above, the interactions of rotavirus with the cell surface, as well as some aspects of the mechanism of entry, have already been characterized for the simian rotavirus RRV, which is NA sensitive and integrin dependent (5, 6, 17, 28, 33). Initially, we determined whether all four strains entered the cell at the same rate. For this, the different viruses were added to MA104 cell monolayers and allowed to bind for 1 h at 4°C; under these conditions, the viral particles bind to the cell surface but do not enter. Unbound viruses were washed off, and a synchronized entry process was started by adding warm medium to the cells. The entry of the viral particles was stopped at different times by removing the virus that had not entered cells with an EGTA wash, which releases the outer layer of the virions and causes the particles to detach from the cell surface. After this step, cells were incubated for 15 h and virus-infected cells were quantitated with an immunoperoxidase focus-forming assay. Figure 1 shows the results of these assays. The rate of entry of all four rotavirus strains differed greatly; RRV entered the cells with a half-time of about 35 min, whereas only 20% of strain UK had entered after 90 min of incubation. Strains TFR-41 and Wa had intermediate rates of entry, with half-times of approximately 60 and 90 min, respectively.

The infectivity of all four rotavirus strains depends on the presence of cholesterol. It has been shown that depletion of cholesterol from the cell membrane, using chelating agents such as methyl- β -cyclodextrin (M β CD), results in a severe decrease in the infectivity of the simian strain RRV, its variant nar3, and the human strain Wa (19). To determine if rotavirus strains TFR-41 and UK also depend on cholesterol for cell entry, the cells were treated with M β CD and the effect on the

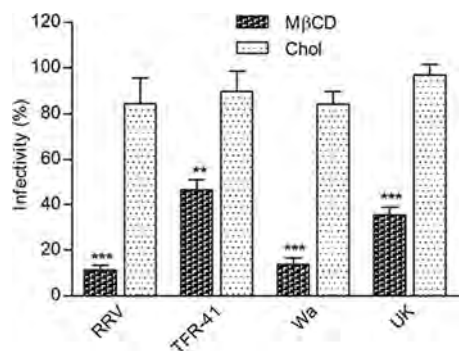


FIG. 2. Cholesterol depletion reduces the infectivity of all four rotavirus strains. MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with 10 mM M β CD for 1 h at 37°C and washed with MEM, and then, water-soluble cholesterol (100 μ g/ml) was added or not added to cells for 1 h at 37°C. Finally, all wells were infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strains. Fifteen h.p.i., infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay using a rabbit serum to rotavirus as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the number of FFUs observed in control untreated cells, which was taken as 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of four independent experiments performed in duplicate are shown.

infectivity of the viral strains was measured. The results in Fig. 2 show that all four rotavirus strains were susceptible to cholesterol depletion, suggesting that they all depend on the presence of cholesterol to infect the cells. To discard possible secondary effects associated with M β CD treatment, cholesterol was restored to cells after treatment with this drug and the infectivity was measured (Fig. 2). We found that cholesterol replenishment restored the infectivity of all rotavirus strains, suggesting that the presence of cholesterol is required for virus entry.

All rotavirus strains interact with hsc70. We have previously found that the heat shock protein hsc70 plays an important role as a postattachment receptor for RRV (18, 60). Here, we tested whether the other strains analyzed also used hsc70 during their interaction with the cell surface. In these assays, the cell monolayer was incubated with different concentrations of monoclonal antibodies directed to hsc70 or to hsp70 as a control. After this incubation, cells were infected with the different rotavirus strains and their infectivity was determined at 15 h.p.i. We found that the infectivity of Wa, TFR-41, and UK decreased by about 30 to 40% (depending on the viral strain) when the infection was performed in cells preincubated with the anti-hsc70 antibody, while the infectivity in cells that were preincubated with the control antibody to hsp70 was not affected (Fig. 3A and B). These results indicate that all four strains tested require the presence of hsc70 on the cell surface.

Preventing endosomal acidification affects the infectivity of some rotavirus strains. We and others (1, 25, 50) have found that preventing the acidification of endosomes does not affect the cell entry of RRV. Here, we tested the effects of NH₄Cl and bafilomycin A1 on the infectivity of Wa, TFR-41, and UK. Cells were preincubated with these reagents and were then infected with the different rotavirus strains. The effect of preventing the acidification of endosomes on the infectivity was determined by the detection of infected cells as described in Materials and Methods at 15 h.p.i. (Fig. 4). As expected, the

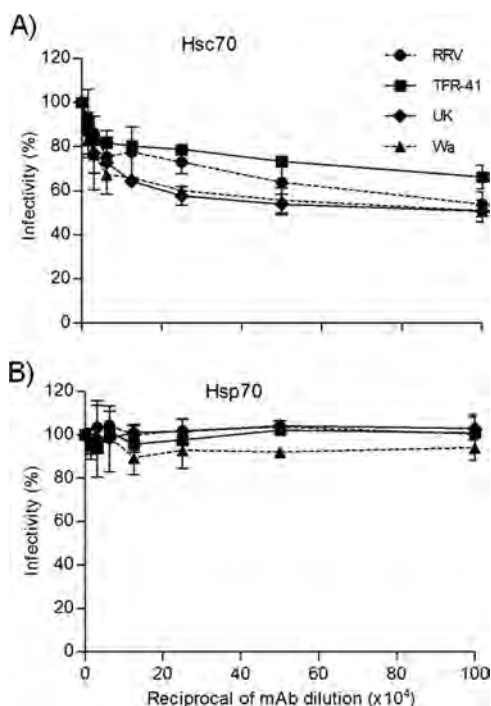


FIG. 3. Rotavirus infectivity is blocked by an antibody to hsc70. MA104 cells for 90 min at 37°C. After this incubation period, cells were infected with the indicated rotavirus strains (2,000 FFUs per well) for 1 h at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity when cells were preincubated with PBS as control. The arithmetic means \pm standard deviations of the results from at least two independent experiments are shown.

infectivity of RRV was not reduced by any of the concentrations of NH₄Cl tested. In contrast, the infectivity of the other rotavirus strains was affected, as was the infectivity of reovirus that was used as a positive control. Similar results were obtained with bafilomycin A1, which prevents acidification of the endosomes by inhibiting the vacuolar ATPase (12). The infectivity of RRV with this treatment was slightly but statistically significantly affected (Fig. 4). Taken together, these data suggest that strains TFR-41, Wa, and UK depend on the acidification of the endosome to efficiently infect MA104 cells, while RRV seems to be less sensitive to changes in the endosomal pH.

The low endosomal pH might be required to trigger conformational changes in some of the viral proteins needed for the virus to escape the endosomal compartment. Alternatively, an acidic pH might be required for optimal function of the endosomal cysteine proteases cathepsin L and cathepsin B, whose activity has been shown to be required for reovirus infectivity (14). To determine if cathepsin L was needed for rotavirus entry, we tested the effect of an inhibitor of this protease on the infectivity of the different rotavirus strains. Reovirus was used as a positive control for these experiments. We found that while the inhibition of cathepsin L severely blocked the infectivity of reovirus at the concentration tested, it did not signif-

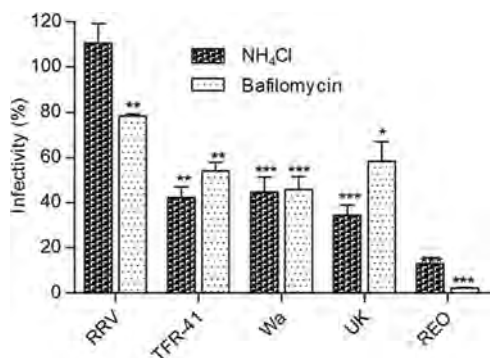


FIG. 4. Effects on rotavirus infectivity of treatments that prevent the acidification of endosomes. MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with 100 mM NH_4Cl or with 0.5 μM bafilomycin A1 at 37°C for 30 min or 1 h, respectively. Cells were then infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strains, maintaining the reagents during the adsorption period of 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity observed in control untreated cells, taken as 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least five independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

icantly affect the infectivity of any rotavirus strain (data not shown).

Macropinocytosis and caveola-mediated endocytosis are not involved in rotavirus entry. To test whether some rotavirus strains enter cells through macropinocytosis or caveola-mediated endocytosis, we inhibited these two pathways and determined the effect on rotavirus infection. To inhibit the caveolin-dependent route, we transfected the cells with a construct expressing a dominant-negative mutant form of caveolin-1 (with amino acids 1 to 81 deleted) or with a plasmid encoding the wild-type form of this protein (54). The results in Fig. 5A show that cells expressing the dominant-negative mutant caveolin-1 were infected by all four rotavirus strains but were not infected by SV40, which has been previously shown to enter through caveola-mediated endocytosis and which was used as a positive control in these assays.

To block macropinocytosis, we treated the cells with 5-(*N,N*-dimethyl)amiloride hydrochloride (DMA), an inhibitor of the Na^+/H^+ pump, which has been shown to inhibit this pathway (31). None of the rotavirus strains tested were affected by this treatment (Fig. 5B), whereas the uptake of fluorescently labeled dextran, which is known to enter through macropinocytosis, was inhibited (data not shown). Together, these results suggest that neither macropinocytosis nor caveola-mediated endocytosis is involved in rotavirus entry.

Treatments that inhibit clathrin-mediated endocytosis alter the infectivity of some rotavirus strains. To establish if clathrin-dependent endocytosis is involved in the entry of the strains studied, we determined the effect of treating MA104 cells with a hypertonic medium (containing sucrose at different concentrations), which results in the dissociation of clathrin vesicles from the plasma membrane (20, 21). The results in Fig. 6A show that, while the infectivity of RRV was barely affected at 250 mM, the highest sucrose concentration tested, the infectivity of the other three strains and reovirus decreased signif-

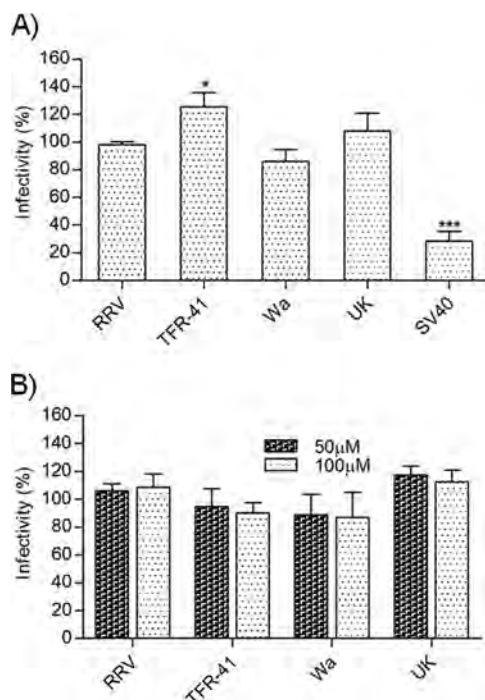


FIG. 5. Blocking caveola-mediated endocytosis or macropinocytosis does not reduce rotavirus infectivity. (A) MA104 cells were transfected with plasmids expressing wild-type or the dominant-negative mutant of caveolin-1. Transfected cells were infected with the different viruses and processed for IF assay. Both wild-type and mutant proteins were detected through GFP expression. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. The numbers of infected cells in the GFP-positive transfected cells were scored ($n \geq 100$), and infectivities are expressed as percentages of the infected cell number in the cells transfected with wild-type or dominant-negative constructs. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments are shown. (B) MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with the indicated concentrations of DMA at 37°C for 30 min. Cells were then infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strain, maintaining DMA during the adsorption period of 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentages of the virus infectivity observed in control untreated cells, representing 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

icantly. These results point out the fact that different rotavirus strains may enter the cells through different pathways.

To confirm the role of the clathrin-mediated endocytosis pathway in the entry of some rotavirus strains, we silenced the expression of the clathrin heavy chain by RNA interference (RNAi), treatment that blocks the formation of clathrin cages, and in consequence, the uptake of clathrin-mediated endocytosis ligands, such as transferrin (38). Cells were transfected with an siRNA directed to the clathrin heavy chain, and at 72 h posttransfection, the cells were infected with different rotavirus strains. At 6 h.p.i., cells were fixed and stained with antibodies to clathrin and to rotavirus, and the number of infected cells that were transfected with the siRNA against clathrin were counted and compared with the number of infected cells that were detected when an irrelevant siRNA was used as a control.

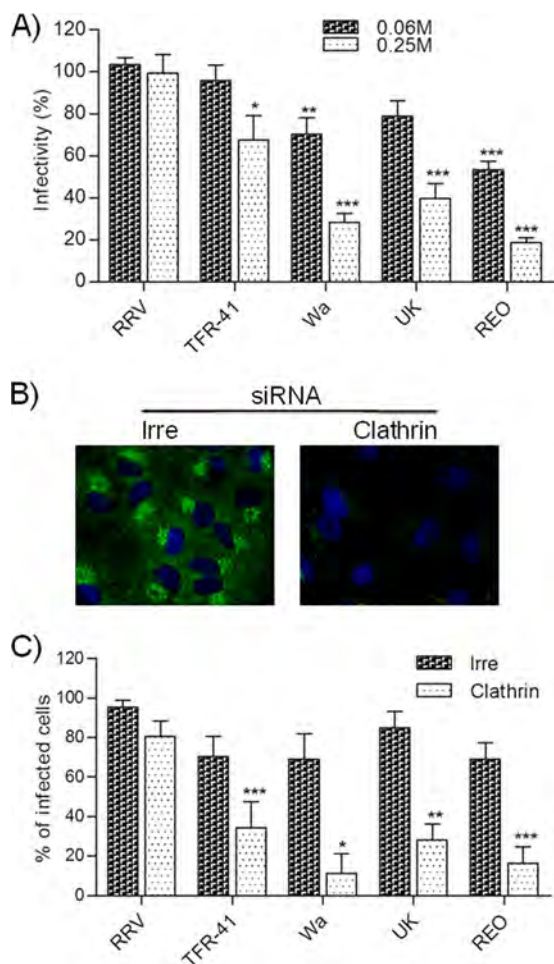


FIG. 6. Effects on rotavirus infectivity of treatments that affect clathrin-mediated endocytosis. (A) MA104 cells grown in 96-well plates were pretreated with the indicated concentrations of sucrose for 10 min at 37°C. Cells were then infected with 2,000 FFUs of the indicated rotavirus strains, maintaining the hypertonic medium during the adsorption period of 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 15 h at 37°C. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the virus infectivity observed in control untreated cells, which represents 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of five independent experiments performed in duplicate are shown. (B) Immunofluorescence assay showing the silencing of clathrin heavy chain. MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs (Irre, irrelevant GFP siRNA); at 72 h post-transfection, the cells were fixed and processed for IF using an antibody to the clathrin heavy chain (green), and the nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). (C) MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs and, at 72 h posttransfection, were infected with the different strains of rotavirus or reovirus. At 6 h.p.i., cells were fixed and processed for IF as indicated in Materials and Methods. Rotavirus-infected cells were monitored using an anti-NSP2 rabbit antibody, and reovirus-infected cells were detected by an antireovirus rabbit antibody, followed by incubation with antirabbit Alexa 568. The numbers of infected cells were scored, and the infectivities are expressed as percentages of the numbers of infected cells found in the cells transfected with the siRNAs ($n \geq 150$). The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test).

The results in Fig. 6B show that there was a very efficient knockdown of the expression of clathrin, since few cells (approximately 10% of the control-transfected cells) were still able to express this protein. Under these conditions, the uptake of fluorescently labeled transferrin was blocked (data not shown). When the effect on infectivity of silencing this protein was measured, we found that the infectivity of RRV was not significantly affected by this treatment, confirming our previous results (50). In contrast, the infectivity of TFR-41, UK, Wa, and reovirus was decreased when the clathrin heavy chain was knocked down. The human strain Wa appeared to be the most sensitive, since there was about an 80% reduction of its infectivity under these conditions (Fig. 6C).

Role of dynamin in rotavirus entry. Dynamin is a large GTPase that is responsible, among other things, for scission of vesicles from the plasma membrane (10). A dominant-negative mutant form of dynamin II, mutant K44A that contains a single amino acid change in the GTPase domain, has been used extensively to inhibit both caveolar and clathrin endocytosis and to define the role of these pathways in the cell entry of several viruses (16, 24, 44, 58). In order to define the role of dynamin in the entry of rotaviruses, MA104 cells were transiently transfected with plasmids that encode either Dyn-wt or the mutant Dyn-K44A, as described in Materials and Methods. The transfected cells were then infected with the different strains of rotavirus or with reovirus, and the number of transfected cells (as detected by an anti-HA antibody [see Materials and Methods]) that were infected was scored (Fig. 7A). We found that the infectivity of all the strains tested was decreased by about 70%, suggesting that dynamin is involved in the entry of all rotavirus strains tested.

Dynamin and clathrin are important during the entry step of rotaviruses. Since it was conceivable that the knockdown of either clathrin or dynamin affected the infectivity of rotaviruses at a postentry step (39, 48), we analyzed whether the inhibitory role of these two proteins was during the entry process. For this, the expression of dynamin and clathrin was silenced by RNAi and cells were transfected with purified DLPs from RRV, TFR-41, and UK viruses. DLPs lack the outer layer proteins and, thus, are not able to bind and enter MA104 cells. Transfection of DLPs into cells overcomes the entry step of the virions. If the absence of clathrin or dynamin were affecting a process after viral entry, we would expect the infectivity of the transfected DLPs to be decreased. We found that silencing the expression of clathrin or dynamin did not affect the infectivity of any of the viral strains tested (Fig. 7B), suggesting that the effect of their absence is indeed at the virus entry level. The knockdown effectiveness of each of these proteins was assessed by Western blot analysis (Fig. 7C). The protein level of the clathrin heavy chain was reduced almost 100%, whereas there was approximately 11% dynamin II still expressed in siRNA-transfected cells. We were not able to purify enough viral particles from the human strain Wa to perform these assays, but they would be expected to behave like the other rotavirus strains.

DISCUSSION

The early interactions of rotavirus with its host cell have been extensively characterized for simian strain RRV (19, 50,

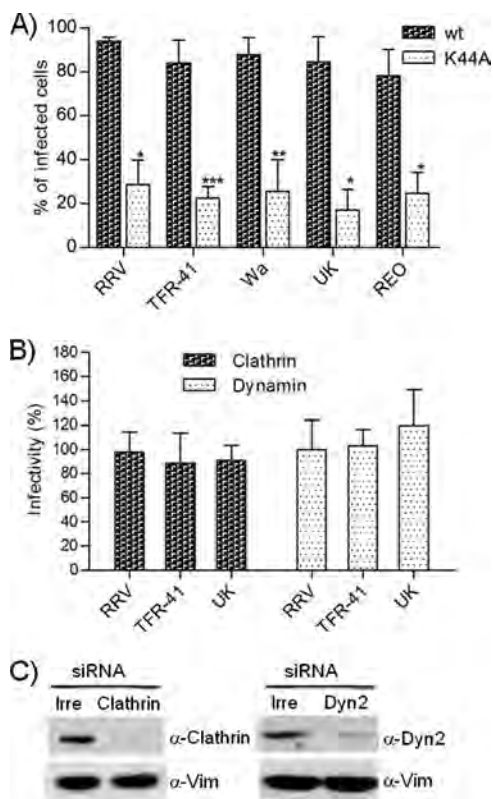


FIG. 7. Rotavirus entry depends on clathrin and dynamin II. (A) MA104 cells were transfected with plasmids expressing the wild type or the K44A form of dynamin II. Transfected cells were infected with the different viruses and processed for IF. Both wild-type and K44A proteins were detected with an anti-HA tag MAAb. Infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. The numbers of infected cells in the HA-positive transfected cells were scored ($n \geq 100$), and the infectivities are expressed as the percentages of the infected cell number in the cells transfected with wild-type or dominant-negative constructs. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments are shown. REO, reovirus. (B) siRNA-transfected cells were transfected with DLPs of the indicated rotavirus strains for 1 h at 37°C. After this period, the transfection mixture was removed and cells were kept in MEM. At 15 h.p.i., cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. The data are expressed as the percentage of the number of FFUs observed in the control (irrelevant siRNA-transfected cells), which represents 100%. The arithmetic means \pm standard deviations of the results of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ (paired t test). (C) Immunoblot analysis of cell lysates from cells transfected with the indicated siRNA (Irre, irrelevant GFP siRNA). The antibodies used are indicated as follows: α -Clathrin, anti-clathrin heavy chain; α -Dyn2, antidyminin; α -Vim, antivimentin (used as a loading control).

60); however, differences among rotavirus strains in their use of cellular receptors (5, 6, 17, 34) leave open the question of whether they all enter the cell through the same pathway. We chose four rotavirus strains that differ in their requirements of interaction with sialic acids and integrins. RRV was used as a strain representative of the NA-sensitive, integrin-dependent phenotype and for comparison with the other strains selected (Table 1).

We initially evaluated the entry rates of the four selected strains and found that each strain entered the cell at a different

rate (Fig. 1). Despite these differences, all four strains depended on the presence of cholesterol on the cell surface. Interestingly, the only interaction that all strains had in common with the previously characterized rotavirus receptors was with the heat shock cognate protein hsc70, since antibodies to this protein blocked the infectivity of all four strains at very similar levels.

When the effect on viral infectivity of preventing the acidification of endosomes was determined, we found that the entry of strains TFR-41, Wa, and UK was pH dependent, while RRV did not seem to require a low endosomal pH, although a slight but significant effect of bafilomycin A was observed for this strain. The inhibition of cathepsin L did not affect the infectivity of any of the four rotavirus strains tested (results not shown), suggesting that the dependence of TFR-41, Wa, and UK on endosomal acidification is not due to a requirement of the activation of this protease. Since viruses internalized through clathrin-mediated endocytosis usually require an acidic environment (42), we evaluated the role of this endocytic pathway in the entry of the different strains. To our surprise, and in contrast to our previous findings with RRV, we found that treatment of cells with a hypertonic medium, which precludes the formation of clathrin cages, and silencing the expression of the clathrin heavy chain, which is an essential component of the clathrin triskelion (15, 59), decreased the infectivity of all the strains except RRV, suggesting that the entry of these viruses is through a clathrin-mediated endocytosis. Accordingly, we also found that all viruses tested depended on the presence of a functional dynamin.

The use of reovirus type 1 as a positive control for many of the assays performed in this work demonstrated that this virus enters MA104 cells through clathrin-mediated endocytosis, as has been described in L cells (30). This observation is interesting in light of recent findings that have established that the entry route of some viruses depends not only on the virus but also on the cell line tested. For example, SV40, a virus whose entry has been extensively studied, behaved differently in CV1 cells, where the virus enters through caveolae, and in Huh-7 cells, where the virus does not use this entry pathway (9, 43). As has been shown previously (50) and in this study, SV40 enters MA104 cells through a caveolin-dependent pathway.

The results presented in this work show that different rotavirus strains differ not only in their receptor usage but also in their entry pathway. Table 2 summarizes the results found in

TABLE 2. Summary of the results obtained in this work

Treatment	Effect on infectivity of strain:			
	RRV	TFR-41	UK	Wa
MBCD	***	***	***	***
Hsc70	**	**	**	**
NH ₄ Cl	—	***	***	***
Bafilomycin A1	*	**	***	**
Sucrose	—	**	***	***
Clathrin	—	***	***	***
Caveolae	—	—	—	—
Macropynocytosis	—	—	—	—
Dynamin	***	***	***	***

—, no effect; *, <30% reduction; **, 30 to 50% reduction; ***, >50% reduction.

this study. Interestingly, a correlation between the cell receptors used and their entry pathway was not found. RRV, the virus that seems to enter cells faster, is the only virus that does not enter the cell via clathrin- or caveola-mediated endocytosis (50; this work) or macropinocytosis (this work). The other three virus strains tested depend on clathrin-mediated endocytosis (caveolin-dependent or macropinocytosis uptake were ruled out).

The findings in this work could help to clarify the different, sometimes even contradictory results which have been reported in the literature when characterizing different rotavirus strains (22). For instance, different results have been reported for the role of low pH on entry and for the role of the Ca^{2+} concentration necessary for viral uncoating. It was reported that the infectivities of porcine strain OSU and simian strain SA11 were affected when the cells were treated with bafilomycin A1, an inhibitor of the endosomal H^{+} -ATPase (12), whereas under the same conditions, the infectivity of RRV was not affected (3, 8). Similar results were obtained when compounds that raise the intracellular calcium concentration were used with different rotavirus strains (8, 29). These apparently contradictory results might be explained by intrinsic differences in the rotavirus strains used in each work, and most probably not by the different experimental conditions employed. It is also important to point out that the rotavirus strains that have been used in these studies have been adapted to grow in cell culture for a long time, and their entry modes may differ from those of wild-type strains when infecting enterocytes.

It has already been observed that viruses belonging to the same genus use different endocytosis pathways to infect the host cell. Human rhinovirus 14 (HRV14) and HRV2 use different receptors for host cell attachment and, similar to rotavirus strains, the uptake of these rhinoviruses by the cells is different; HRV2 enters through the clathrin-mediated pathway, whereas HRV14 entry is independent of clathrin, caveolin, and flotillin (26, 51). This phenomenon is also illustrated among the *Polyomaviridae* family; human polyomaviruses JCV and BKV enter the cell through clathrin-dependent and caveola-mediated endocytosis, respectively (13, 37, 45–47), although they finally converge in the endoplasmic reticulum (47). The observation that rotaviruses isolated from different animal origins use distinct entry mechanisms is thus not unexpected. It is tempting to speculate that rotavirus affinity, the order of interactions, or the signaling molecules activated through virus binding to its receptors may induce a particular endocytic mechanism. It remains to be determined whether or not the vesicular trafficking used by all these viruses converges at some point such that they share their final destination in the cell's cytoplasm to start transcription at the same cellular site.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pedro Romero for his help in virus purification and to Paul Gaytan and Eugenio Lopez for their support with the synthesis of oligonucleotides.

This work was supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, grant IN210807 from DGAPA-UNAM, and grant 60025 from CONACyT. M.G. is the recipient of a scholarship from CONACyT.

REFERENCES

- Bass, D. M., M. Baylor, C. Chen, and U. Upadhyayula. 1995. Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells. *Virology* **212**:429–437.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**:6964–6972.
- Chemello, M. E., O. C. Aristimuno, F. Michelangeli, and M.-C. Ruiz. 2002. Requirement for vacuolar H^{+} -ATPase activity and Ca^{2+} gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J. Virol.* **76**:13083–13087.
- Chu, J. J., and M. L. Ng. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* **78**:10543–10555.
- Ciarlet, M., and M. K. Estes. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* **80**:943–948.
- Ciarlet, M., J. E. Ludert, M. Iturriza-Gomara, F. Liprandi, J. J. Gray, U. Desselberger, and M. K. Estes. 2002. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J. Virol.* **76**:4087–4095.
- Crawford, S. E., S. K. Mukherjee, M. K. Estes, J. A. Lawton, A. L. Shaw, R. F. Ramig, and B. V. Prasad. 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J. Virol.* **75**:6052–6061.
- Cuadras, M. A., C. F. Arias, and S. Lopez. 1997. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* **71**:9065–9074.
- Damm, E. M., L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Mezzacasa, T. Kurzchalia, and A. Helenius. 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**:477–488.
- Danino, D., and J. E. Hinshaw. 2001. Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:454–460.
- Dormitzer, P. R., E. B. Nason, B. V. Prasad, and S. C. Harrison. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* **430**:1053–1058.
- Drose, S., and K. Altendorf. 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**:1–8.
- Eash, S., W. Querbes, and W. J. Atwood. 2004. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J. Virol.* **78**:11583–11590.
- Espejo, R. T., S. Lopez, and C. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**:156–160.
- Fotin, A., Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, and T. Walz. 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**:573–579.
- Ghigo, E., J. Kartenbeck, P. Lien, L. Pelkmans, C. Capo, J. L. Mege, and D. Raoult. 2008. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog.* **4**:e1000087.
- Graham, K. L., P. Halasz, Y. Tan, M. J. Hewish, Y. Takada, E. R. Mackow, M. K. Robinson, and B. S. Coulson. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* **77**:9969–9978.
- Guerrero, C. A., D. Bouyssouade, S. Zarate, P. Isa, T. Lopez, R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, S. Lopez, and C. F. Arias. 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* **76**:4096–4102.
- Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362–9371.
- Hansen, S. H., K. Sandvig, and B. van Deurs. 1993. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* **121**:61–72.
- Heuser, J. E., and R. G. Anderson. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**:389–400.
- Isa, P., M. Gutierrez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2008. Rotavirus cell entry. *Future Virol.* **3**:135–146.
- Isa, P., M. Realpe, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**:370–381.
- Johannsdottir, H. K., R. Mancini, J. Kartenbeck, L. Amato, and A. Helenius. 2009. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J. Virol.* **83**:440–453.
- Kaljit, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**:1136–1144.
- Khan, A. G., A. Pickl-Herk, L. Gajdzig, T. Marlovits, R. Fuchs, and D. Blaas. 2010. Human rhinovirus 14 enters rhabdomyosarcoma cells expressing ICAM-1 by a clathrin, caveolin, and flotillin-independent pathway. *J. Virol.* **84**:3984–3992.
- Lopez, S., and C. F. Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**:271–278.

28. **Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg.** 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* **70**:487–493.
29. **Ludert, J. E., F. Michelangeli, F. Gil, F. Liprandi, and J. Esparza.** 1987. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* **27**:95–101.
30. **Maginnis, M. S., B. A. Mainou, A. Derdowski, E. M. Johnson, R. Zent, and T. S. Dermody.** 2008. NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J. Virol.* **82**:3181–3191.
31. **Marechal, V., M. C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* **75**:11166–11177.
32. **Mayor, S., and R. E. Pagano.** 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:603–612.
33. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**:5253–5259.
34. **Mendez, E., S. Lopez, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias.** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**:450–459.
35. **Mercer, J., and A. Helenius.** 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**:531–535.
36. **Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **82**:1496–1504.
37. **Moriyama, T., J. P. Marquez, T. Wakatsuki, and A. Sorokin.** 2007. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J. Virol.* **81**:8552–8562.
38. **Motley, A., N. A. Bright, M. N. Seaman, and M. S. Robinson.** 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**:909–918.
39. **Nicoziani, P., F. Vilhardt, A. Llorente, L. Hilout, P. J. Courtoy, K. Sandvig, and B. van Deurs.** 2000. Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol. Biol. Cell* **11**:481–495.
40. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200.
41. **Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass.** 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:565–572.
42. **Pelkmans, L., and A. Helenius.** 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**:414–422.
43. **Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**:473–483.
44. **Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius.** 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**:535–539.
45. **Pho, M. T., A. Ashok, and W. J. Atwood.** 2000. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol.* **74**:2288–2292.
46. **Querbes, W., A. Benmerah, D. Tosoni, P. P. Di Fiore, and W. J. Atwood.** 2004. A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J. Virol.* **78**:250–256.
47. **Querbes, W., B. A. O'Hara, G. Williams, and W. J. Atwood.** 2006. Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J. Virol.* **80**:9402–9413.
48. **Royle, S. J., and L. Lagnado.** 2006. Trimerisation is important for the function of clathrin at the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* **119**:4071–4078.
49. **Rust, M. J., M. Lakadamyali, F. Zhang, and X. Zhuang.** 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:567–573.
50. **Sanchez-San Martin, C., T. Lopez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**:2310–2318.
51. **Snyers, L., H. Zwickl, and D. Blaas.** 2003. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **77**:5360–5369.
52. **Stang, E., J. Kartenbeck, and R. G. Parton.** 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* **8**:47–57.
53. **Sun, X., V. K. Yau, B. J. Briggs, and G. R. Whittaker.** 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**:53–60.
54. **Trouet, D., D. Hermans, G. Droogmans, B. Nilius, and J. Eggermont.** 2001. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**:461–465.
55. **Tsai, B.** 2007. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**:23–43.
56. **van der Schaar, H. M., M. J. Rust, C. Chen, E.-M. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X. Zhuang, and J. M. Smit.** 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* **4**:e1000244.
57. **Veiga, E., and P. Cossart.** 2005. Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **7**:894–900.
58. **Wang, K., S. Huang, A. Kapoor-Munshi, and G. Nemerow.** 1998. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J. Virol.* **72**:3455–3458.
59. **Young, A.** 2007. Structural insights into the clathrin coat. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**:448–458.
60. **Zarate, S., M. A. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. O. Juarez, M. Camacho-Nuez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* **77**:7254–7260.