



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Estudio del papel de las proteínas de uniones estrechas en la  
infección por rotavirus**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

Doctor en Ciencias Bioquímicas

**PRESENTA:**

M. en C. Jesús Miguel Torres Flores

**TUTOR PRINCIPAL**

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz  
Instituto de Biotecnología- UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu  
Instituto de Biotecnología- UNAM

Dr. Ramón González García-Conde  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Ciudad de México. Agosto, 2016



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.

## **Agradecimientos profesionales**

**A Carlos y Susana:** Gracias por su paciencia, confianza y sobre todo por cada una de las lecciones de vida que recibí de ustedes.

**A Ramón y Takuya:** Gracias por ser uno de los apoyos más importantes que tuve a lo largo de este camino.

**A Blanca Lilia Barrón:** Gracias por ser mi primera maestra y por siempre haber confiado en mi.

**A Rafa y Don Pedrito:** Gracias por ser los mejores maestros!!! Don Peter, hasta donde quiera que esté, mil gracias!!!!

**A todos mis compañeros del laboratorio:** Gracias a todos y cada uno por formar parte de este camino. Nada hubiera sido igual sin ustedes.

## **Agradecimientos personales**

**A mis familia:** Gracias por educarme para ser quien soy hoy en día. Tengo a los mejores padres y al mejor hermano del mundo! Esta tesis es suya! Los amo.

**A Diego:** Gracias por siempre estar ahí, en las buenas y en las malas, pese a las circunstancias. Gracias a ti estoy aquí. Te amo

**A la familia Velasco Ureña:** Gracias por siempre estar al pendiente, por su cariño y por acompañarme en todo este camino.

**A mis hermanos:** Daniela, Hippie, Marel, Yubnub y Andrea Peralta. Ustedes lo vivieron TODO conmigo, hubiera tirado la toalla muchas veces si no hubieran estado a mi lado. Los amo con locura a todos y cada uno de ustedes!!

**A toda mi banda del DF:** Esto es lo que estaba haciendo cuando estuve lejos! Gracias por seguir siendo parte de mi familia cuando no estuve cerca.

**A la hermandad de Satanás:** Gracias por estar ahí desde sus trincheras! Pasan los años y seguimos juntos!!! Va la última pa ustedes!!!! Los adoro!!

## **ÍNDICE**

	<b>Página</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>vi</b>
<b>Resumen</b>	<b>viii</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>16</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>20</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>21</b>
<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<b>Discusión</b>	<b>54</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>66</b>
<b>Referencias</b>	<b>67</b>
<b>Anexo I</b>	<b>81</b>
<b>Anexo II</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Origen de las proteínas estructurales de los rearreglantes RRV x YM utilizados en este trabajo.	<b>48</b>
---	-----------

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura general de un rotavirus.	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Características estructurales de las proteínas de superficie de rotavirus.	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Modelo de las interacciones iniciales entre rotavirus y sus receptores celulares.	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Ubicación general de las UE en un epitelio polarizado	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b> Estructura de la ocludina humana asociada a la membrana plasmática.	<b>10</b>
<b>Figura 6.</b> Estructura general de una claudina en la membrana celular.	<b>12</b>
	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b> Estructura general de JAM-A, JAM-B, JAM-C y CAR.	
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de las diferentes proteínas que forman la placa citoplásmica de las uniones estrechas.	<b>14</b>
<b>Figura 9 .</b> Localización de las proteínas de UE en células MA104.	<b>26</b>
<b>Figura 10 .</b> Efecto del silenciamiento de la expresión de ZO-1 sobre la localización de JAM-A y ocludina	<b>29</b>
<b>Figura 11 .</b> Las claudinas -9, -14 y -16 no son indispensables para la entrada de rotavirus a células MA104.	<b>31</b>
<b>Figura 12 .</b> Efecto del silenciamiento de la expresión de la proteína JAM-A sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM.	<b>33</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto del silenciamiento de la expresión de la proteína JAM-A sobre la infectividad de rotavirus de las cepas porcinas YM y OSU.	<b>34</b>
<b>Figura 14 .</b> Efecto del silenciamiento de la expresión de ocludina sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM	<b>35</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto del silenciamiento de la expresión de ZO-1 sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM.	<b>36</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto de diferentes concentraciones del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de rotavirus RRV.	<b>38</b>
<b>Figura 17.</b> Efecto del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de diferentes cepas de rotavirus.	<b>39</b>
<b>Figura 18.</b> Efecto post-binding del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de diferentes cepas de rotavirus.	<b>40</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto del anticuerpo J10.4 sobre la unión de rotavirus RRV.	<b>42</b>
<b>Figura 21.</b> Efecto de la incubación de la proteína JAM-A sobre diferentes cepas de rotavirus.	<b>43</b>
<b>Figura 22.</b> Efecto de diferentes concentraciones del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de rotavirus RRV en células Caco-2.	<b>44</b>

<b>Figura 23.</b> Efecto de diferentes concentraciones de la proteína JAM-A soluble sobre la infectividad de rotavirus RRV en células Caco-2.	<b>45</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto de la sobreexpresión en células L de JAM-A, JAM-A DCT y CAR sobre la infección por rotavirus RRV.	<b>47</b>
<b>Figura 25.</b> Efecto del silenciamiento de la proteína JAM-A sobre la infectividad de diferentes rearreglantes RRV x YM.	<b>49</b>
<b>Figura 26.</b> Efecto del anticuerpo monoclonal J10.4 sobre la infectividad de diferentes rearreglantes RRV x YM.	<b>50</b>
<b>Figura 27.</b> Rotavirus co-localiza con ocludina en tiempos tempranos de la infección.	<b>52</b>



## Resumen

Los rotavirus son los agentes etiológicos responsables del mayor número de casos de diarrea aguda severa en niños menores de cinco años. Los rotavirus infectan preferentemente los enterocitos localizados en la superficie de las microvellosidades del intestino delgado. Estas células están altamente polarizadas y en ellas se pueden identificar tres dominios de membrana distintos; el dominio apical, el dominio lateral y el dominio basal. A la fecha, se han identificado varios posibles receptores para estos virus entre los que se encuentran diversos glicanos, integrinas y la proteína hsc70, sin embargo, todos estos receptores se localizan en la membrana basal de los enterocitos y son inaccesibles para las partículas virales que entran en el lumen del intestino delgado. Las uniones estrechas (UE) son uno de los complejos de unión que se ubican hacia el extremo apical de la membrana basal de los enterocitos y otras células polarizadas. Estas uniones están formadas por distintas familias de proteínas transmembranales y citoplásmicas, cuyas funciones incluyen la regulación del transporte de iones a través del espacio paracelular, el establecimiento de la polaridad celular y la transducción de señales desde y hacia las uniones estrechas. Recientemente, en un tamizaje de RNAs de silenciamiento llevado a cabo en el laboratorio se identificaron varias proteínas pertenecientes a las UE que podrían estar involucradas en la entrada de rotavirus. En este trabajo se estudió el papel de las proteínas de uniones estrechas JAM-A, ocludina y ZO-1 durante la entrada de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM a células MA104 no polarizadas. Encontramos que las proteínas JAM-A, ocludina y ZO-1 son importantes para la entrada de rotavirus a estas células. JAM-A funciona como co-receptor para las cepas de rotavirus RRV, UK, Wa pero no para la cepa porcina YM. Mediante el empleo de un panel de virus rearrreglantes derivados de los rotavirus RRV y YM demostramos que la proteína de cápside externa VP4 determina el uso de JAM-A como co-receptor.

# Introducción

## 1. Rotavirus

### 1.1. Características generales de los rotavirus

Los rotavirus están clasificados dentro de la familia *Reoviridae* en el género *Rotavirus* y son considerados los agentes etiológicos responsables del mayor número de casos de diarrea aguda severa en niños menores de 5 años alrededor del mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estos virus provocan la muerte de cerca de 450,000 niños al año, en este rango de edad, principalmente en países en vías de desarrollo en los cuales se presentan alrededor del 85% de los casos (Who.int,2015).

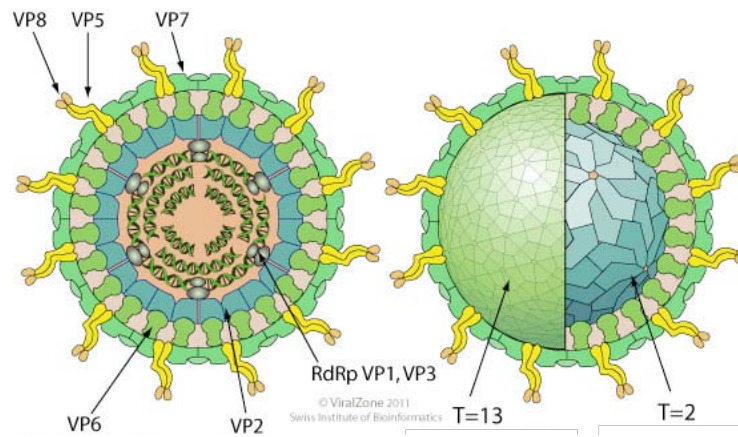
Estructuralmente, las partículas maduras de rotavirus miden aproximadamente 75 nm de diámetro, carecen de envoltura lipídica y presentan una geometría icosaédrica compleja. Cada partícula está formada por tres capas concéntricas de proteína dentro de las cuales está contenido el genoma viral, compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena que codifican para 12 proteínas; seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 Y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1 – NSP6) (Estes, 2013).

Serológicamente, los rotavirus se clasifican en serogrupos (A-F); los rotavirus pertenecientes a los serogrupos A-C se han aislado principalmente de humanos y animales mientras que los rotavirus pertenecientes a los serogrupos D-F se han aislado principalmente de animales. Dentro de cada serogrupo, los rotavirus se subclasifican en serotipos con base en las dos proteínas de la cápside externa del virus (VP4 y VP7) que son capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. Así, existen dos serotipos, el serotipo G (basado en la glicoproteína

VP7) y el serotipo P (basado en la proteína sensible a proteasas VP4) (Estes, 2013).

## 1.2. Estructura de los rotavirus

Las partículas de rotavirus están compuestas por tres cápsides concéntricas de proteína. La cápside interna está compuesta por la proteína VP2 y en su interior están contenidos los 11 segmentos de RNA de doble cadena que conforman el genoma del virus (Figura 1). Además, ancladas en la cara interna de la proteína VP2 se encuentran las proteínas VP1 (RNA polimerasa) y VP3 (guanilil transferasa) (Estes, 2013). Todos los componentes anteriores forman el núcleo o “core” de la partícula viral.

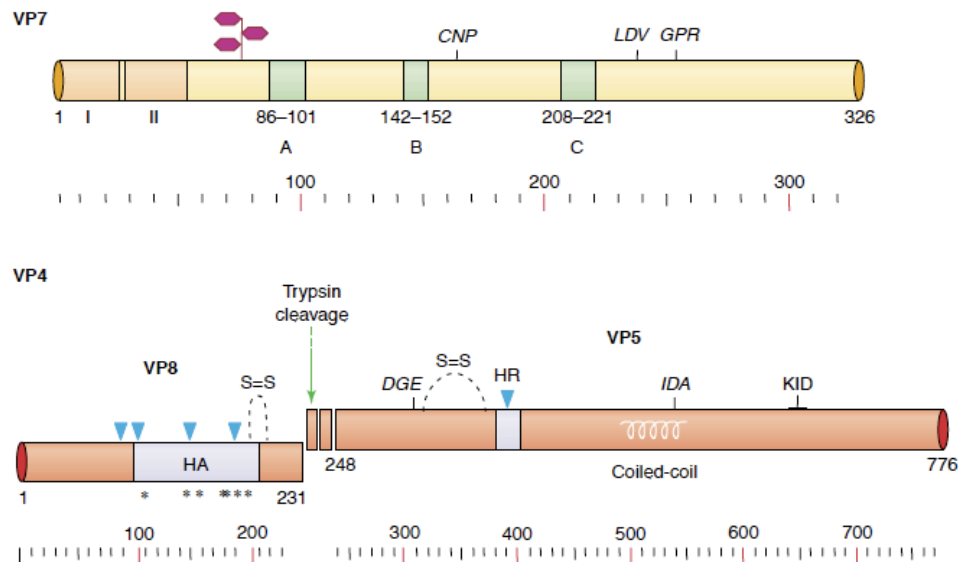


**Figura 1. Estructura General de un rotavirus.** En verde agua se representa la cápside interna formada por VP2 que contiene los 11 segmentos de RNA de doble cadena y las proteínas VP1 y VP3 (esferas grises), en verde limón se representa la cápside intermedia formada por VP6, en verde claro se representa la proteína VP7 y en amarillo la proteína VP4. (Obtenida y modificada de <http://www.expasy.ch/viralzone/>)

La cápside intermedia está compuesta por trímeros de la proteína VP6, la cual es la proteína más abundante en la partícula viral y pese a no estar involucrada directamente en la transcripción del genoma viral es indispensable para que se dé la misma. A las partículas formadas por el núcleo y la cápside intermedia se les denomina DLPs (Double-Layered Particles) o partículas de doble capa y una característica importante de las mismas es que son transcripcionalmente activas.

La proteína VP6 ayuda a mantener la estructura del núcleo de la partícula, en el cual se encuentran los componentes necesarios para la transcripción del genoma viral (Zhang, 2008).

Por último, la cápside externa de la partícula infecciosa está compuesta por 260 trímeros de la glicoproteína VP7 y por 60 trímeros de la proteína VP4 que forman espículas que se proyectan aproximadamente 100 Å desde la superficie de VP7. La proteína VP7 es una proteína de unión a calcio que posee sitios de unión para las integrinas  $\alpha\beta 2$  y  $\alpha 4\beta 1$ , las cuales son considerados coreceptores para algunas cepas de rotavirus (Figura 2) (Settembre, 2011).



**Figura 2. Características estructurales de las proteínas de superficie de rotavirus.** A) Parte superior de la figura, proteína VP7 del rotavirus de simio SA11. Sitio de glicosilación (hexágonos rosas). Sitios de unión para las integrinas  $\alpha\beta 2$  y  $\alpha 4\beta 1$  (LDV y GPR respectivamente). Sitios antigénicos de la proteína VP7 (A, B y C). B) Parte inferior de la figura, proteína VP4 del rotavirus de simio RRV. Región de corte para tripsina, argininas 231, 241 y 247. En VP8, dominio de hemaglutinación (HA). Sitios de unión de anticuerpos neutralizantes (flechas azules) En VP5 Sitios de unión para las integrinas  $\alpha\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$  (DGE e IDA respectivamente). Sitio de interacción con Hsc70 (KID). (Tomada de Lopez, 2004)

La proteína VP4 está involucrada en la unión y en la penetración de las partículas virales a la célula hospedera. Esta proteína tiene capacidad hemaglutinante y posee sitios de corte para tripsina (López, 2006). El corte proteolítico de la proteína VP4 por acción de la tripsina intestinal produce dos fragmentos, VP5 (60

kDa) y VP8 (28 kDa), los cuales permanecen asociados a la partícula viral. Este corte proteolítico es esencial para que la partícula viral entre a su célula hospedera (López, 2006 ; Settembre, 2011).

El dominio VP8 de VP4 está involucrado en el proceso de adsorción de las partículas virales a la superficie celular, debido a que en él se encuentra un dominio de unión a ácido siálico (Dormitzer, 2002; Dormitzer, 2002). Por otro lado, el dominio VP5 de VP4 está involucrado en las interacciones con receptores y coreceptores celulares entre los que se encuentran las integrinas  $\alpha 2\beta 1$ , y la proteína Hsc70 (Figura 2) (Zárate, 2000; Hewish, 2000; Guerrero, 2002; Zárate, 2003).

### **1.3 Unión y entrada de los rotavirus**

Los rotavirus tienen un tropismo celular característico *in vivo*, infectando de manera preferencial los enterocitos maduros localizados en las puntas de las microvellosidades del intestino delgado. *In vitro*, los rotavirus son capaces de infectar una gran variedad de líneas celulares, entre las que se encuentran células derivadas de epitelio renal (MA104, MDCK) y de epitelio intestinal (Caco-2) (Svensson, 1991; Dickman, 2000).

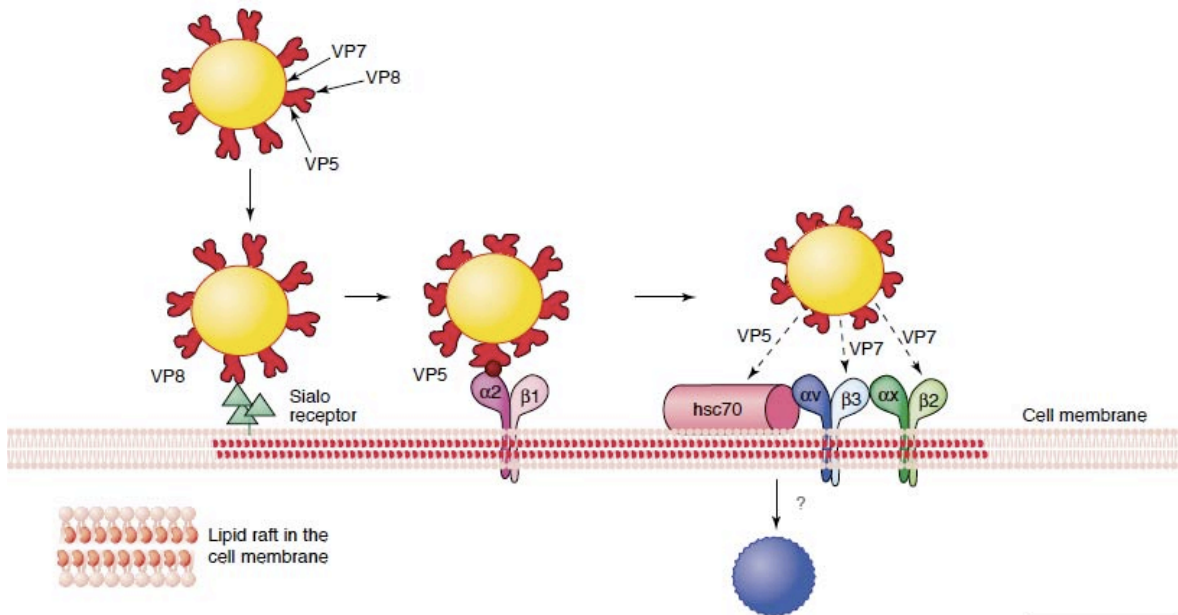
Los enterocitos, son células polarizadas que poseen un núcleo orientado hacia el extremo basal de la célula y un borde en cepillo ubicado hacia el extremo apical. Estas células, al igual que otras células epiteliales, se mantienen unidas entre sí por estructuras especializadas entre las que se pueden mencionar los desmosomas, las uniones adherentes y las uniones estrechas (UE) (Assimakopoulos, 2011).

El proceso de entrada de los rotavirus a su célula hospedera es sumamente complejo y requiere de múltiples pasos. Como ya se mencionó, al inicio de la infección es indispensable que las partículas de rotavirus se activen por acción de

la tripsina intestinal, la cual cataliza el rompimiento de la proteína VP4 en los péptidos VP5 y VP8. Una vez cortada VP4 se inicia una secuencia de interacciones durante los cuales diferentes dominios de las proteínas de la cápside externa del virus (VP5, VP8 y VP7) interactúan con diferentes dominios de proteínas localizadas en la superficie celular, las cuales actúan como receptores y coreceptores durante los pasos de unión y entrada del virus (López, 2004; López, 2006).

La interacción inicial entre el virus y la célula está mediada por el dominio VP8 de la proteína VP4 el cual es capaz de mediar el reconocimiento entre el virus y residuos de ácido siálico asociados a glicoconjugados ubicados en la superficie celular (Figura 3) (Dormitzer, 2002). Se ha demostrado que distintas cepas de rotavirus son capaces de reconocer residuos de ácido siálico terminales o internos de manera diferencial (Haselhorst, 2009). Experimentalmente, el tratamiento de las células con neuraminidasa es capaz de reducir la infectividad de aquellas cepas de rotavirus cuya VP8 se une a residuos de ácido siálico terminales (antes consideradas cepas neuraminidasa sensibles, NS) mientras que dicho tratamiento no afecta a aquellas cepas que se unen a residuos de ácido siálico internos (cepas neuraminidasa resistentes, NR) (Haselhorst, 2009). Recientemente se demostró que algunas cepas humanas de rotavirus también pueden unirse a antígenos sanguíneos, asimismo, se demostró que los rotavirus son capaces de diseminarse al sistema nervioso central; por lo tanto, es posible que la unión a antígenos sanguíneos permita que el virus se disemine vía hematológica, probablemente unido a la superficie de los eritrocitos (Hu, 2013; Ramig, 2004).

Utilizando la cepa nar3, una mutante resistente al tratamiento con neuraminidasa de la cepa de rotavirus de simio RRV, se demostró que la integrina  $\alpha 2\beta 1$  era utilizada durante la unión por la cepa nar3 mientras que la cepa parental RRV se une a dicha proteína en etapas posteriores a la unión a ácido siálico. Además, se demostró que el reconocimiento entre nar3 y la integrina  $\alpha 2\beta 1$  está mediado por el dominio VP5 de la proteína VP4 (Figura 3) (Arias, 2015; Zárate, 2000).



**Figura 3. Modelo de las interacciones iniciales entre rotavirus y sus receptores celulares.** Este modelo representa las interacciones de una cepa que reconoce ácidos siálicos terminales. Inicialmente, el virus reconoce un receptor sialidado en la membrana de la célula hospedera a través del dominio VP8 de VP4. Posteriormente, el virus interactúa con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  a través del dominio VP5 de VP4. Después de esta interacción inicial, el virus interactúa después con hsc70 por medio de VP5 y hsc 70 y la integrina  $\alpha X\beta 2$  por medio de VP7. Finalmente, se da la internalización de las partículas virales con la subsecuente pérdida de las proteínas de cápside externa, con lo que se liberan DLPs al citoplasma celular (Tomada de López, 2004).

Una vez que se ha dado el contacto inicial de rotavirus con residuos de ácido siálico y con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , el virión interactúa con la proteína hsc70 y con las integrinas  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha X\beta 2$ . El dominio VP5 de la proteína VP4 es el que media la interacción entre hsc70 y las partículas virales, ya que anticuerpos dirigidos contra hsc70 son capaces de bloquear la infección del virus sin afectar la unión del mismo a la superficie celular (Guerrero, 2002). Asimismo, el virus es capaz de interactuar con las integrinas  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha X\beta 2$  por medio de la proteína VP7. Sin embargo, a diferencia de hsc70, el reconocimiento a integrinas es diferencial y cada cepa de rotavirus utiliza todos o algunos de estos receptores de manera específica (Zárate, 2004; Graham, 2003; Hewish, 2001).

Muchos de los receptores que se han encontrado para rotavirus se describieron trabajando en la línea celular derivada de epitelio de riñón de mono MA104. En los

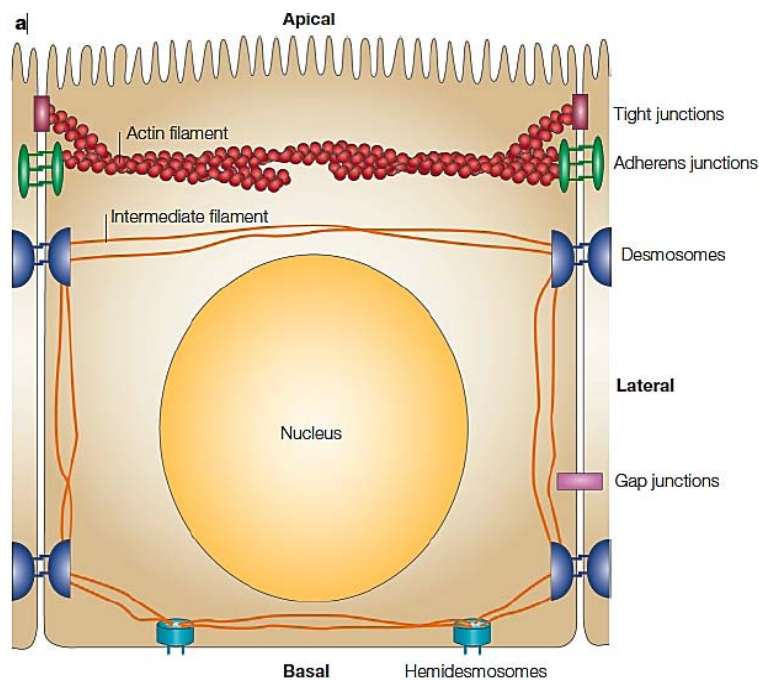
enterocitos, que son las células blanco principales para estos virus, la mayoría de los receptores celulares que se han caracterizado (integrinas principalmente) se localizan en el extremo basolateral de la membrana, por debajo de las UE, por lo que surge la duda de cómo es que estos virus llegan a sus receptores celulares si no son fácilmente accesibles desde la cara apical de los enterocitos.



## 2. Las uniones estrechas

### 2.1 Estructura y función de las uniones estrechas

Las uniones estrechas (UE) son un tipo especializado de unión intercelular que forma parte del complejo de unión que se forma entre dos células epiteliales adyacentes. Las UE forman una estructura continua, circular, en forma de cinturón que se orienta hacia el extremo luminal del espacio intercelular. Su función principal es mantener a las células epiteliales lo suficientemente juntas para evitar la difusión libre de moléculas pequeñas, macromoléculas, microorganismos y células a través del espacio paracelular (Anderson, 1995; Madara, 1998; Nusrat, 2000). Además, actúan como barrera física entre el dominio apical y el dominio basolateral de la membrana de las células epiteliales polarizadas, por lo que a su vez evitan la difusión libre de proteínas y otras moléculas de membrana de un dominio al otro (Shin, 2006; Tsukita, 2001).



**Figura 4. Ubicación general de las UE en un epitelio polarizado.** Las uniones estrechas (tight junctions), en rojo, se localizan hacia el extremo apical de la membrana basolateral de una célula polarizada. Por debajo de las UE se encuentran otros tipos de uniones especializadas como las uniones adherentes (Adherens junctions), en verde, los desmosomas, en azul oscuro, y las gap junctions, en rosa (Tomado de Matter, 2003).

Además de ser importantes para el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular (Shin, 2006) las UE están involucradas en varias vías de señalización (Matter, 2003; Steed, 2010), transmitiendo señales desde el exterior de la célula hacia el interior de la misma y viceversa, regulando así una gran cantidad de procesos celulares entre los que se encuentran la polarización, la proliferación, la expresión génica y la diferenciación celular (Matter, 2005).

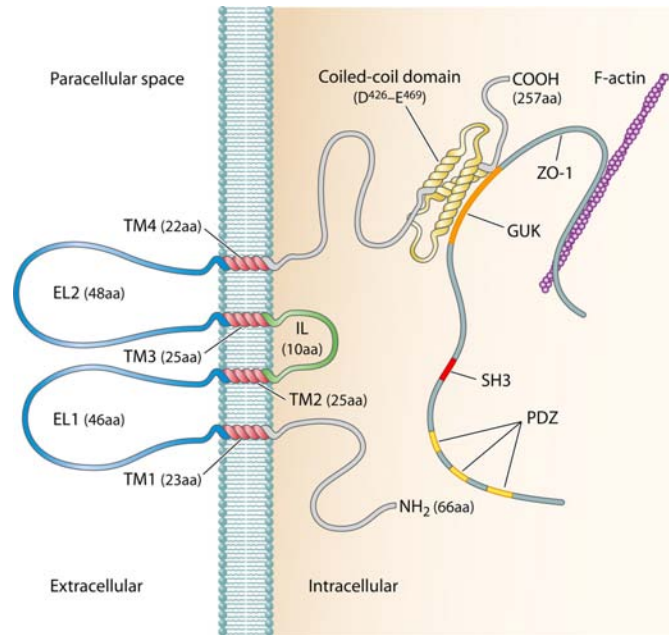
Estructuralmente, las UE son complejos multiprotéicos formados por varias proteínas integrales de membrana. Estas proteínas están a su vez asociadas con proteínas citoplásmicas adaptadoras, las cuales forman una placa que sirve para unir los componentes membranales de las UE con el citoesqueleto de actina además de permitir el reclutamiento de un gran número de proteínas señalizadoras hacia las proximidades de las UE (Fanning, 1998, Matter, 2003; González-Mariscal, 2008). A la fecha se han identificado más de 40 proteínas en las uniones estrechas (Schneeberger,2004). Sin embargo, existen tres familias de proteínas transmembranales y una familia de proteínas citoplásmicas (placa citoplásmica) características de este tipo de uniones.

## **2.2 Proteínas integrales de membrana de las uniones estrechas**

### **2.2.1 Proteínas MARVEL asociadas a uniones estrechas (TAMPs)**

La ocludina fue la primera proteína transmembranal de las uniones estrechas que se identificó (McCarthy,1996). Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas MARVEL asociadas a uniones estrechas o TAMPs por sus siglas en inglés (Tight Junction-Associated MARVEL proteins). Dentro de esta familia de proteínas también se encuentran otras proteínas de UE como son la tricelulina y la proteína MarvelD3 (Ikenouchi, 2005; Raleigh,2010; Steed,2009). Todas las proteínas pertenecientes a esta familia poseen en común un dominio MARVEL, el cual es un dominio putativo de interacción lípido-proteína que está formado por cuatro hélices transmembranales (Sánchez-Pulido, 2002).

La ocludina es una proteína de 65 kDa que atraviesa la membrana plasmática cuatro veces y posee dos asas extracelulares que son ricas en glicina y tirosina. Posee además dos colas citoplásmicas que representan el extremo amino terminal y el carboxilo terminal. Este último interactúa con proteínas citoplásmicas pertenecientes a la familia MAGUK (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) así como con el citoesqueleto de actina (Fanning, 1998; Itoh, 1999; Haskins, 1998).



**Figura 5. Estructura de la ocludina humana asociada a la membrana plasmática.** En la figura se observan los dominios individuales que forman parte de la ocludina así como el número de aminoácidos que los componen. Dominio extracelular 1 (EL1). Dominio extracelular 2 (EL2). Regiones transmembranales (TM1-TM4). Asa intracelular (IL). En la figura se muestran los dominios de interacción de la ocludina con proteínas de placa citoplásmica (ZO-1, ZO-2) y con el citoesqueleto de actina orientados hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína. (Tomado de Cummins, 2012)

La ocludina es muy importante para el correcto funcionamiento de las UE. Al sobreexpresar esta proteína en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), la resistencia transepitelial en estos cultivos se incrementa considerablemente (McCarthy, 1996). Asimismo, ciertos péptidos sintéticos derivados de las asas extracelulares de esta proteína pueden incrementar la permeabilidad paracelular

debido a que interfieren en la interacción entre las asas extracelulares de las moléculas de ocludina en células adyacentes (Lacaz-Vieira, 1999; Wong, 1997).

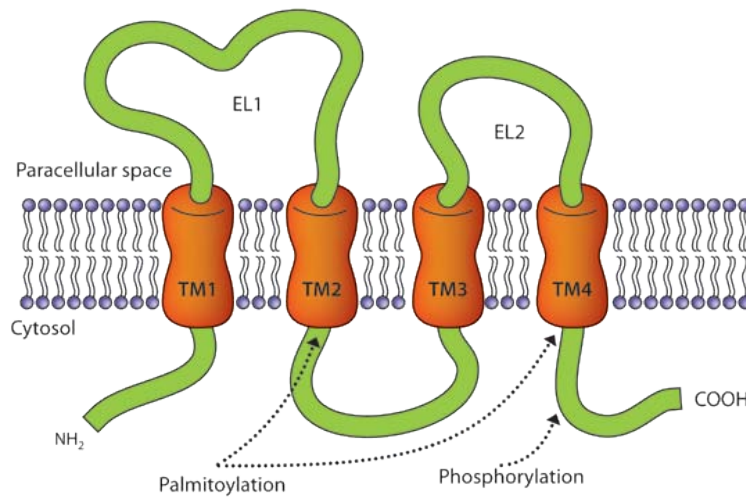
Dentro de las UE existen otras proteínas relacionadas estructuralmente con la ocludina, las cuales, al igual que esta última, poseen un dominio MARVEL, y se localizan en dominios de membrana ricos en colesterol (Raleigh, 2010). Estas proteínas son la tricelulina y la proteína MARVELD3. Las funciones de estas proteínas no se conocen con claridad a la fecha sin embargo se piensa que están involucradas en procesos de señalización intracelular (Fredriksson, 2015).

### **2.2.2 La familia de las claudinas**

Las claudinas son proteínas de 20-27 kDa que atraviesan la membrana celular cuatro veces, con sus extremos amino y carboxilo terminales orientados hacia el citoplasma de la célula. Poseen, además, dos asas extracelulares, una de aproximadamente 52 residuos que regula el paso selectivo de iones a través del espacio paracelular y otra más corta de tamaño variable (13 – 33 residuos) que está involucrada en las interacciones homofílicas y heterofílicas entre claudinas de células adyacentes o entre claudinas de la misma célula (Van Itallie, 2010). En el humano se han identificado 23 claudinas, que se expresan de manera diferencial en distintos tipos de epitelios, en los cuales se pueden expresar una o más isoformas de esta proteína (Lal-Nag, 2009).

Al igual que la ocludina, las claudinas pueden interactuar con proteínas citoplásmicas de la familia MAGUK (Membrane-associated guanylate kinase homologs) y se ha demostrado, que las interacciones entre ZO-1, ZO-2 y miembros de la familia de las claudinas son esenciales para la formación de las uniones estrechas (Itoh, 1999; Umeda, 2009). Se ha observado que péptidos derivados de las asas extracelulares de las claudinas reducen la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y provocan la desaparición de las UE en células polarizadas, por lo que se considera a las claudinas las proteínas estructurales

más importantes para la formación y mantenimiento de este tipo de uniones (Piontek, 2008).

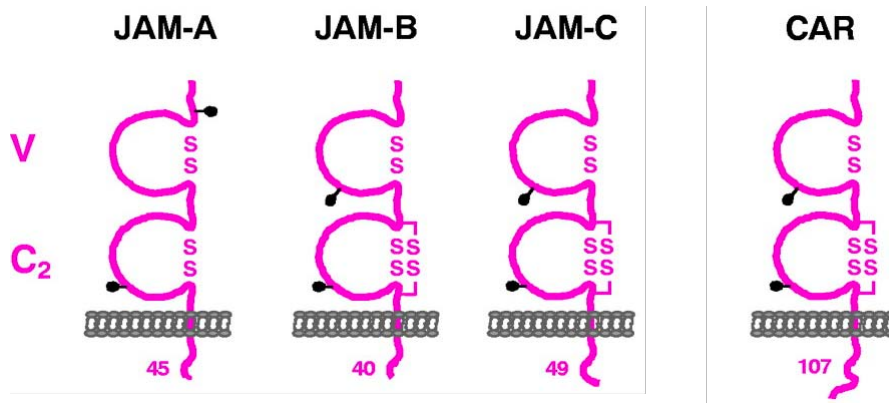


**Figura 6. Estructura general de una claudina en la membrana celular.** En la figura se observan las dos asas extracelulares de las claudinas (EL1 y EL2). También se observan las regiones transmembranales de las claudinas (TM1-TM4) así como las porciones citoplásmicas de las mismas en las cuales se indican los sitios de palmitoilación y fosforilación (Tomada de [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_CLDN7.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CLDN7.html)).

### 2.2.3 Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas

Los últimos componentes transmembranales que se encuentran formando parte de las UE, JAM (Junctional adhesion molecule) y CAR (Coxsackievirus and Adenovirus receptor), pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas proteínas van de los 30 a los 40 kDa y presentan una sola región transmembranal, una cola citoplásmica corta y un dominio extracelular con dos plegamientos parecidos a inmunoglobulinas (Ig-like) (Kostrewa, 2001). En el extremo carboxilo terminal de JAM-A se ubica un dominio PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1 binding domain) el cual le permite interactuar con las proteínas que forman la placa citoplásmica de las UE entre las que se encuentran ZO-1, ZO-2, par6 y par3 (Monteiro, 2013; Ebnet, 2001; Bazzoni, 2000 ).

Existen tres isoformas de JAM denominadas JAM-A, JAM-B y JAM-C, las cuales tienen una identidad en su secuencia de aminoácidos de 36% y se encuentran expresadas en distintos tipos celulares, JAM-A en células epiteliales (Laukoetter, 2007) JAM-C en el endotelio de vasos sanguíneos y linfáticos (Muller, 2003) y JAM-B es característica del endotelio de las vénulas (Bazzoni, 2003).



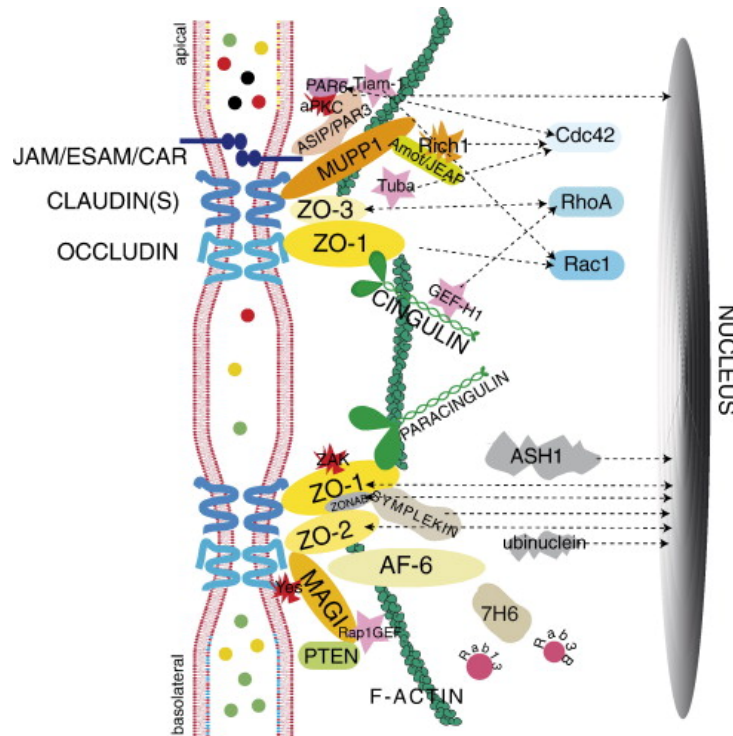
**Figura 7. Estructura general de JAM-A, JAM-B, JAM-C y CAR.** Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas que forman parte de las UE son JAM-A, JAM-B, JAM-C y CAR. Estas proteínas presentan un dominio tipo-V similar a inmunoglobulinas en la porción distal a la membrana y un dominio tipo-C2 similar a inmunoglobulinas en la porción proximal a la membrana. El sitio de homodimerización se ubica en el dominio V.

Los miembros de la familia de JAM tienen distintas funciones, se sabe por ejemplo que JAM-A está involucrada en la formación de las uniones estrechas ya que es capaz de reclutar a otras proteínas estructurales de las UE como ZO-1 y ocludina hacia la membrana plasmática. Además, las distintas isoformas de JAM están involucradas en la migración leucocitaria y en procesos de activación de plaquetas (Ludwig, 2005).

#### 2.2.4 Las proteínas de placa citoplásmica

Para establecer una conexión entre el exterior y el interior de la célula, las proteínas transmembranales que conforman las uniones estrechas interactúan con una serie de proteínas citoplásmicas que poseen dominios PDZ (PSD/DlgA/ZO-1) por medio de ciertos motivos específicos ubicados en sus porciones citoplásmicas.

Varias proteínas citoplásmicas como ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (Itoh, 1999), Par-3 and Par-6 (Hung, 1999) y las proteínas MAGI (Guillemot, 2008) también poseen dominios PDZ por lo que pueden interactuar con los dominios citoplásmicos de las proteínas transmembranales que forman las UE.



**Figura 8. Representación esquemática de las diferentes proteínas que forman la placa citoplásmica de las uniones estrechas.** En la imagen se muestran las proteínas transmembranales de las UE (JAM/ESAM/CAR, claudinas y ocludina) insertadas en la membrana de dos células adyacentes. Las proteínas más importantes de la placa citoplásmica ZO-1, ZO-2, ZO-3, PAR-3, PAR-6, MUPP1, MAGIs y AF-6 se muestran en esta figura. También se muestran algunas cinasas (aPKC, ZAK, c-Yes) representadas en color rojo. (Tomada de Guillemot, 2008)

Las proteínas de la zonula ocludens (ZO) pertenecen a la familia de MAGUK y son proteínas citoplásmicas que se caracterizan por poseer dominios PDZ, SH3 y un dominio de guanilato cinasa (González-Mariscal, 2000) Se conocen tres diferentes tipos de proteínas ZO; ZO-1, ZO-2 y ZO-3, las cuales se pueden unir a diferentes proteínas estructurales de las uniones estrechas. Por ejemplo, se sabe que ZO-1 y ZO-2 se pueden unir a ocludina y JAM a través de sus dominios PDZ

(Bazzoni, 2000) y que ZO-1 es necesaria para que las proteínas de la familia de las claudinas se localicen en las UE (Umeda, 2006). Por otro lado, ZO-1 tiene la capacidad de unirse al citoesqueleto de actina por medio de un dominio rico en prolinas (Fanning, 1998) mientras que ZO-2 se puede unir al citoesqueleto de actina a través de la proteína asociada a actina 4.1R (Mattagajasingh, 2000).

Las funciones de las proteínas que forman la placa citoplásmica son variadas. Por un lado están encargadas de regular el proceso de polarización celular y la formación de las UE (Guillemot, 2008). Por otro, sirven como base para que otras proteínas involucradas en procesos de señalización, como la proteína cinasa C (PKC), Rho, y las GTPasas Rab y Ras sean reclutadas, lo cual las vuelve importantes también durante procesos de señalización intracelular (Mattagajasingh, 2000).



### 3. Antecedentes

Muchos virus que infectan células epiteliales, como el virus de la influenza, han evolucionado para utilizar receptores y co-receptores que se ubican en el dominio apical de las células epiteliales, lo cual facilita su entrada a sus células hospederas y el proceso de infección (Chan, 2009). Por otro lado, muchos otros virus utilizan moléculas ubicadas en la cara basolateral de las células epiteliales, las que generalmente se encuentran inaccesibles para las partículas virales debido a que están ubicadas por debajo de las uniones estrechas. Para superar esta barrera, muchos virus han desarrollado elegantes estrategias para abrir las UE con el fin de llegar a sus receptores celulares, y muchos otros incluso son capaces de utilizar a las proteínas de UE como receptores de entrada (Coyne, 2005).

Una de las primeras proteínas de UE que se identificó como receptor viral es el receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR). Esta proteína, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, no se encuentra accesible de manera general a las partículas virales que entran en contacto con el epitelio respiratorio. Varios tipos de adenovirus se pueden unir a CAR con una alta afinidad (Coyne, 2005), sin embargo, la unión de adenovirus a la superficie celular y su entrada posterior al citoplasma de la célula son dos procesos distintos que están sumamente coordinados. Una vez que las partículas de adenovirus se unen a residuos de ácido siálico presentes en la superficie celular, las partículas virales interaccionan con su correceptor de entrada. Estos correceptores incluyen varias moléculas ubicadas en la membrana basal del epitelio, como las integrinas  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 5$  (Wickham, 1993)  $\alpha 5\beta 1$  (Davison, 1997), así como las integrinas  $\alpha\beta 1$  (Li, 2001) y  $\alpha 3\beta 1$  (Salone, 2003). La unión de adenovirus a CAR abre las uniones estrechas y permite que el virus tenga acceso a su receptor de entrada.

Los coxsackievirus tipo B, al igual que algunos adenovirus, utilizan la proteína CAR durante su entrada a su célula hospedera (Milstone, 2005). Las cepas de coxsackievirus capaces de infectar el epitelio intestinal se unen inicialmente a una

proteína localizada en la cara apical de los enterocitos, el factor acelerador del decaimiento (DAF) (Shieh, 2002). La interacción de las partículas virales con DAF provoca la activación de la tirosina cinasa c-ABI, la cual activa a la GTPasa Rac. La activación de Rac induce un rearrreglo del citoesqueleto que facilita el transporte de las partículas virales unidas a DAF hacia las uniones estrechas, donde el virus se une a CAR para entrar a su célula hospedera (Coyne, 2006).

De manera interesante, la internalización de las partículas virales está acoplada con la internalización de otra proteína de UE, la ocludina. Se ha observado que las partículas virales co-localizan con ocludina dentro de vesículas endocíticas en el interior de la célula (Coyne, 2007), sin embargo, aún se desconoce si las partículas virales se asocian a ocludina durante su entrada. La unión de echovirus 11 también es dependiente de su unión a DAF, la cual también transporta al virus hacia las UE para su entrada (Sobo, 2011).

Otro virus capaz de utilizar proteínas de UE para la entrada a su célula hospedera es el virus de la hepatitis C (HCV). Este virus se une a diversas moléculas en la superficie celular, entre las que se encuentran CD81, SR-BI y LDLR (von Hahn, 2008). En años recientes, se demostró que la proteína de UE claudina-1 también es importante para la entrada de HCV pese a que el virus es incapaz de unirse a la misma. Mutaciones puntuales en el primer asa extracelular de la claudina-1 impiden que esta proteína se asocie con otras claudinas en la membrana de una célula adyacente y de igual manera bloquean la infección viral (Evans, 2007). También se demostró que la claudina-1 es capaz de asociarse a CD81 para promover la entrada del virus, una propiedad que también comparte con las claudinas 6 y 9 (Zheng, 2007).

Las uniones estrechas son consideradas una barrera primaria para los patógenos que infectan los epitelios, debido a que mantienen juntas a las células epiteliales de manera que ningún virus o bacteria sea capaz de alcanzar a las células que yacen debajo de los epitelios. El hecho de que muchos virus hayan evolucionado

para utilizar proteínas de UE como receptores y co-receptores puede ser útil para sobrepasar esta barrera.

Se sabe que la entrada de rotavirus a su célula hospedera es un proceso complejo que ocurre en varios pasos secuenciales. Como ya se mencionó, la infección inicia con el reconocimiento de las dos proteínas virales que conforman la cápside externa (VP4 y VP7) a varios receptores y correceptores celulares distintos, entre los que se encuentran moléculas de ácido siálico, las integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$  además de la proteína constitutiva de choque térmico 70 (hsc 70) y algunos gangliósidos (Guerrero, 2000; Guerrero, 2002; Martínez, 2014; López, 2004; Arias, 2001; Isa, 2006).

Se ha demostrado que los receptores utilizados por rotavirus durante su entrada a la célula se asocian de manera preferencial a los microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas (Isa, 2004; Cuadras, 2003; Delmas, 2007). Sin embargo, es probable que a la fecha no se hayan identificado todas las moléculas celulares involucradas en el reconocimiento virus-receptor, principalmente debido a que la mayor parte de receptores que se han descrito para estos virus se han identificado en células MA104, las cuales derivan de epitelio de riñón de mono y no presentan las mismas moléculas de membrana que los enterocitos maduros del intestino delgado que son las células blanco para estos virus.

Ya que rotavirus infecta células polarizadas de manera natural y debido a que los receptores conocidos se localizan por debajo de las uniones estrechas, una las interrogantes que existen es la manera en la que estos virus sobrepasan dicha barrera. Nava y cols. (2004) demostraron que la proteína viral VP8 altera la integridad de las uniones estrechas en células MDCK polarizadas y que además, es capaz de inhibir la formación de las mismas. Sin embargo, en estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio por Silva-Ayala (2013) en los cuales se probó una biblioteca de RNAs interferentes pequeños (siRNAs) dirigida hacia distintos genes celulares, para determinar el efecto que tiene la inhibición de la síntesis de

distintas proteínas celulares sobre la infección del rotavirus RRV en células MA104, se demostró que la infección por RRV se ve disminuida cuando se silencian genes que codifican para proteínas de la familia de las claudinas (claudinas -9, -14 y -16) y de la familia JAM (JAM-A), lo que por primera vez abrió la posibilidad de que estas proteínas fueran necesarias para la infección.

En los últimos años, el uso de técnicas de microscopía de fluorescencia *in vivo* así como el uso de interferencia de RNA (RNAi) y de dominantes negativas ha permitido a los investigadores estudiar los mecanismos de infección de numerosos virus con lo que se han caracterizado algunas etapas de su mecanismo de infección.

Actualmente se han elucidado algunos pasos del proceso de entrada de rotavirus a células MA104, así como algunas moléculas que podrían ser usadas por estos virus como receptores y correceptores celulares, sin embargo, todavía faltan muchos aspectos por caracterizar, por lo que en este trabajo se propuso estudiar el papel que juegan las proteínas de uniones estrechas en el proceso de entrada de rotavirus a células MA-104.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

- Estudiar el papel de las proteínas de uniones estrechas en la infección por rotavirus

### **4.2 Objetivos Particulares**

1. Determinar la expresión y localización de proteínas de uniones estrechas en células MA104.
2. Investigar si rotavirus requiere proteínas de uniones estrechas como receptores o co-receptores para entrar a células MA104
3. Caracterizar la proteína viral involucrada en el uso de JAM-A como co-receptor celular

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Células y virus**

Se utilizó la línea celular MA104 derivada de epitelio de riñón de mono rhesus. Las células se crecieron en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 6% de suero fetal de bovino (SFB). La línea celular Caco-2 se creció en medio DMEM suplementado con aminoácidos esenciales y 10% de suero fetal de bovino. Las cepas de rotavirus RRV fueron proporcionadas por H.B. Greenberg (Universidad de Stanford, Stanford, CA) y Y. Hoshino (NIAID, Bethesda, MA). Las cepas bovinas UK fueron donadas por D. R. Snodgrass (Instituto de Investigación Moredun, Edinburgo, Reino Unido) y por Y. Hoshino (NIAID, Bethesda, MA). La cepa Wa fue obtenida a través de H. B. Greenberg (Universidad de Stanford, Stanford, CA). La cepa YM se aisló en nuestro laboratorio. Todas las cepas de rotavirus se propagaron en células MA104 como describió Pando en 2002. El reovirus tipo 1 fue donado por C. Ramos (CISEI, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico). Las rearreglantes RRV X YM fueron obtenidas en nuestro laboratorio por Marco A. Espinoza (IBT-UNAM). La cepa de SV-40 fue donada por L.Gutiérrez (Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México). Las células infectadas con SV-40 se detectaron mediante un ensayo de focos fluorescentes utilizando un antiSV40 Tag MAb (Stang, et al., 1997).

### **5.2 Transfección de siRNAs**

RNAs pequeños interferentes contra las proteínas de uniones estrechas JAM-A, CLDN-9, CLDN-14, CLDN16, OCLN y ZO-1 fueron obtenidos de Dharmacon Research (Lafayette, CO); como control irrelevante se utilizó un siRNA contra luciferasa y como control positivo se utilizó un siRNA contra la proteína viral VP2. La transfección de los siRNAs en células MA104 se llevó a cabo de la siguiente

manera: Se diluyeron 15  $\mu$ L de oligofectamina (OF) (Invitrogen, Carlsbad, CA) en 1 mL de MEM (Eagle's minimal essential medium) y se incubó esta mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla anterior se añadió a un pozo de una placa de 48 pozos que contenía el siRNA diluido en MEM (1:20). Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente se añadieron 200  $\mu$ L de una suspensión que contenía  $5 \times 10^4$  células / mL a cada pozo y se incubaron las células a 37°C por 72 horas, después de las cuales se removió la mezcla de transfección y se lavaron las células dos veces con MEM. Posteriormente se infectaron estas células con rotavirus como se describió anteriormente.

### **5.3 Ensayos de inmunoperoxidasa**

Las células infectadas con rotavirus se fijaron con acetona al 80% en PBS y se incubaron las células con un anticuerpo policlonal de conejo dirigida contra las partículas completas de rotavirus (anti-TLPs) por una hora a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se trataron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa. Los focos infecciosos se pusieron en evidencia tal y como está descrito en Cuadras, 1997. Las unidades formadoras de focos (FFUs) se contaron en un microscopio Visiolab 200 (Biocom, Les Ulises, France) y los resultados se expresan como UFF/ml.

### **5.4 Bloqueo de la infección por rotavirus utilizando anticuerpos y péptidos.**

Células MA104 crecidas a confluencia en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con MEM y se trataron con diferentes concentraciones del anticuerpo anti JAM-A J10.4 (Santacruz,CA) por 90 minutos a 37°C. Después del período de incubación, el anticuerpo se retiró de las células y estas se infectaron con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 3 por una hora a 37°C. Después del período de adsorción, se removió el inóculo viral y se lavaron las células dos veces con MEM para posteriormente dejar seguir la infección por 8 horas a 37°C. Las células

infectadas se fijaron y se tiñeron por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. Para normalizar los resultados se tomó como referencia el control de virus sin tratamiento.

### **5.5 Bloqueo de la infección por rotavirus (post-binding) utilizando anticuerpos y péptidos.**

Para determinar si los anticuerpos y péptidos anti-JAM eran capaces de inhibir la infectividad de rotavirus después de adsorber el virus a la superficie celular, se lavaron células MA104 crecidas en placas de 96 pozos dos veces con MEM frío. Posteriormente se adsorbió el virus a 4°C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron las células dos veces con MEM frío y se añadieron los anticuerpos anti-JAM, los péptidos derivados de JAM-A o el anticuerpo anti-CD46 utilizado como control de isotipo y se incubaron las distintas mezclas a 4°C durante 60 minutos. Posteriormente se lavaron las células con MEM y se dejó seguir la infección durante 14 horas a 37°C. Las células infectadas se fijaron y se tiñeron por inmunoperoxidasa. Para normalizar los resultados se tomó como referencia el control de virus sin tratamiento.

### **5.6 Inmunofluorescencia**

Las células se crecieron en cubreobjetos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS por 20 minutos. Después de este tiempo se lavaron tres veces con una solución de PBS que contenía 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl y posteriormente se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100 en solución de bloqueo (50 mM de NH<sub>4</sub>Cl y albúmina sérica bovina [BSA] al 1% en PBS) por 15 minutos. Una vez completado este tiempo de incubación se lavaron las células 3 veces con una solución de PBS-NH<sub>4</sub>Cl y se bloquearon con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl y BSA al 1% en PBS toda la noche a 4°C. Se incubaron las células con anticuerpo primario por 1 hora y posteriormente se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con Alexa 488. Se montaron los



cubreobjetos en los que se crecieron las células en laminillas de vidrio utilizando Fluorkeep (Argene, Varilhes, Francia) y se analizaron por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss Axioskop 2 mot plus acoplado a una cámara digital (Photometrics cool snap HQ). Las imágenes se capturaron digitalmente y se editaron utilizando el programa Pixelmator versión 1.5.1 Spider.

## **5.7 Unión de virus a la membrana celular.**

Las monocapas de células MA104 se preincubaron con 0.1 µg/ml del anticuerpo J10.4 y se infectaron posteriormente con cada virus en frío por 30 minutos. Se removió el inóculo y se lavó 3 veces con medio sin suero frío, antes de resuspender en la solución de lisis (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl; 0.1% de Triton X-100). El virus se liberó por descongelación dos veces y se detectó por ELISA (Zárate et al., 2003 ).

## **5.8 Infección de rotavirus en células que sobreexpresan JAM-A.**

Se crecieron células L929 sobre cubreobjetos de vidrio hasta alcanzar una confluencia del 70%. Posteriormente, se transfectaron estas células con 500 ng de un plásmido que codifica para la proteína hJAM-A (pcDNA3.1/JAM-A), hCAR (pcDNA3.1/CAR), hJAM-A ΔCT (pcDNA3.1/JAM-A ΔCT) o con el plásmido vacío (Barton et al., 2001) utilizando lipofectamina ® LTX (Life Technologies). A las 48 horas post transfección, se infectaron las células transfectadas con 2000 UFFs por pozo de rotavirus de la cepa RRV, y las células infectadas se detectaron por un ensayo de inmunoperoxidasa. La eficiencia de transfección se determinó por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal J10.4 y fue de aproximadamente 40%. Los plásmidos que codifican para JAM-A, JAM-A ΔCT y CAR fueron donados por T.S. Dermody (Vanderbilt University, Tennessee).

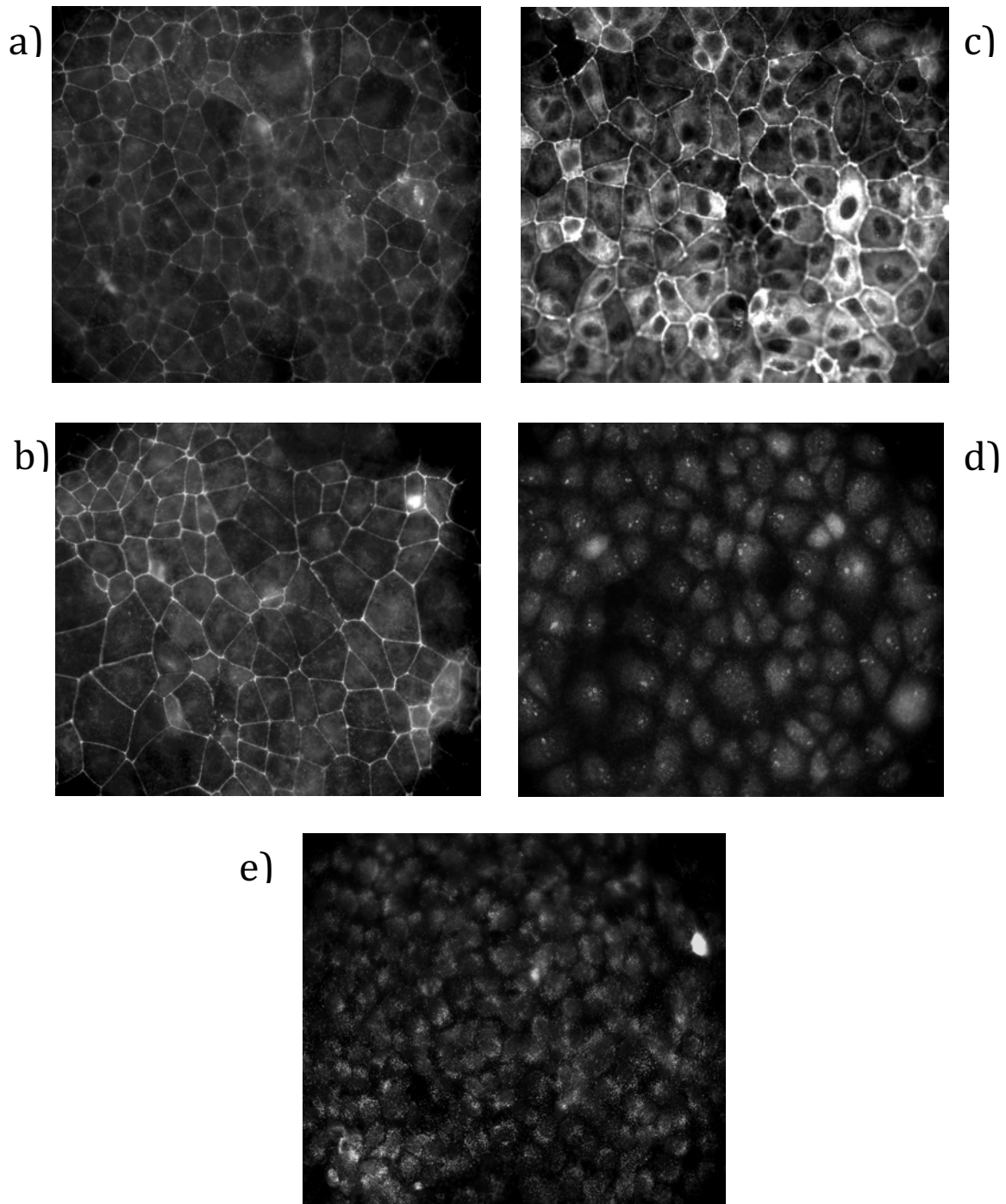
## **6. Resultados**

### **6.1 Las proteínas de uniones estrechas JAM-A, ocludina y ZO-1 se localizan en el espacio intercelular en monocapas de células MA104.**

El sistema ideal para estudiar la biología de los rotavirus son las células MA104, las cuales derivan de epitelio de riñón de mono y son altamente susceptibles a la infección por estos virus. Debido al origen epitelial de dichas células, éstas pueden polarizarse si se cultivan durante 14 días sobre filtros Transwell con poros de 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Ciarlet, 2001), lo cual indica claramente que las células MA104 expresan las proteínas necesarias para la formación de uniones estrechas (UE) funcionales.

Silva-Ayala y colaboradores (2013) demostraron que las proteínas de UE JAM-A, ocludina y ZO-1 son importantes para la entrada de rotavirus de la cepa de simio RRV a células MA104 no polarizadas, lo cual sugiere que dichas proteínas de UE se expresan en células MA104 incluso cuando no se crecen en condiciones que favorezcan su polarización. En este trabajo se utilizaron células MA104 no polarizadas, las cuales no forman UE funcionales y nos permitieron estudiar con mayor profundidad el papel de algunas proteínas componentes de las UE en el ciclo de replicación de rotavirus.

En cultivos de células epiteliales polarizadas, las proteínas de UE se localizan hacia el extremo apical de la cara basolateral de las células, mostrando un patrón de “panal” al teñirse por inmunofluorescencia (Anderson, 2009). Con el fin de determinar si las proteínas de UE tienen una localización similar en monocapas de células MA104 no polarizadas, decidimos caracterizar la localización de JAM-A, ocludina, ZO-1, claudina-14 y claudina-16 en monocapas de dichas células mediante técnicas de inmunofluorescencia (Figura 9).



**Figura 9 . Localización de las proteínas de UE en células MA104.** Las proteínas a) JAM-A, b) ocludina y c) ZO-1 se localizan en las uniones intercelulares de monocapas confluentes de células MA104 no polarizadas. Para ZO-1 se observa también localización citoplásmica. La proteína d) Claudina 14 se puede observar tanto difusa en el citoplasma como condensada en el núcleo de células MA104 mientras que la e) Claudina-16 se observa como un puntillero difuso en el citoplasma.

Para determinar la localización de la proteína JAM-A (figura 9a) se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal dirigido contra la porción más distal a la membrana de su dominio extracelular. Esto nos permitió detectar JAM-A utilizando células no permeabilizadas, por lo que la señal que se observa en la figura 9a corresponde a la proteína que se expresa en la membrana de las células. La proteína JAM-A se localizó de principalmente en las uniones célula-célula, mostrando una localización similar a la que se observa para esta proteína en cultivos polarizados de células MDCK II (Andreeva, 2001).

Por otro lado, se determinó la localización de la ocludina utilizando un anticuerpo dirigido contra su región C-terminal (citoplásmica) (figura 9b). Se llevaron a cabo los ensayos de inmunofluorescencia en células permeabilizadas. Al igual que la proteína JAM-A, la ocludina se localizó mayormente en las uniones célula-célula y muestra un patrón clásico de panal, como el que se observa para las proteínas de UE en epitelios y en cultivos de células epiteliales polarizadas (Osaki, 1999).

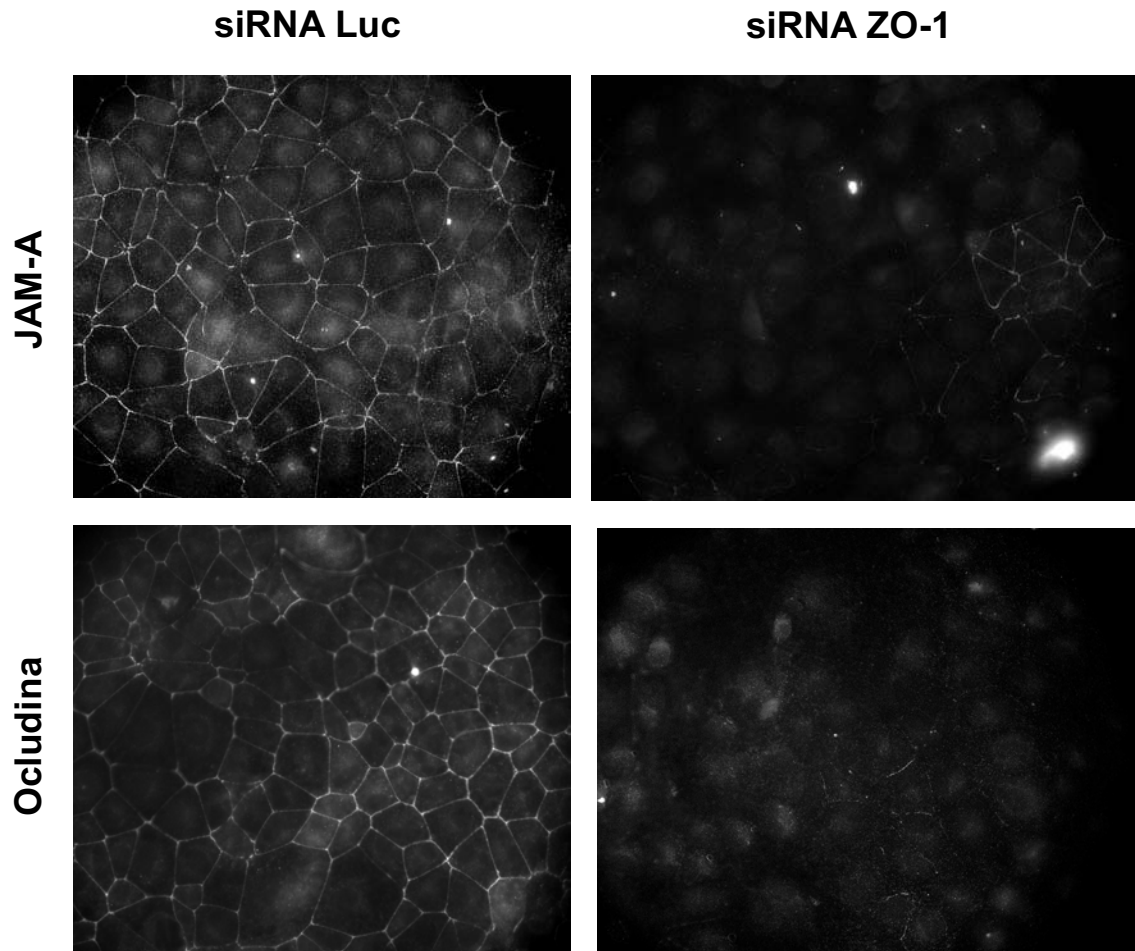
La localización de las claudinas -14 y -16 se determinó utilizando un anticuerpo dirigido contra una de sus porciones citoplásmicas (C-terminal), por lo que de nuevo se permeabilizaron las células para llevar a cabo las inmunofluorescencias. De manera interesante, ninguna de las dos claudinas estudiadas (-14 y -16) parece localizarse en el espacio intercelular (figuras 9d y 9e), más aún, la claudina-14 muestra una localización difusa en el citoplasma y parece encontrarse también en el núcleo de las células. Por otro lado, la claudina-16 se observa como un puntillero difuso en el citoplasma celular. Esta localización es congruente con el hecho de que los cultivos con los que trabajamos no están polarizados, y la localización de las claudinas en las uniones célula-célula es uno de los marcadores que existen para definir un epitelio polarizado (Van Itallie, 2006).

Una vez que se determinó la localización de algunos miembros de las tres familias de proteínas transmembranales que forman las UE, se decidió determinar también la localización de ZO-1, una proteína que forma parte de la placa citoplásmica que

le da sostén a las uniones estrechas y que además está involucrada en el transporte de las proteínas transmembranales desde las UE hacia el aparato de golgi para ser degradadas y desde el aparato de golgi hacia las UE. Como se observa en la figura 9c, la señal de la proteína ZO-1 se observó tanto en el espacio intercelular como en el citoplasma de las células. La proteína ZO-1 está involucrada en procesos de señalización intracelular así que su localización citoplásmica no resulta extraña (Itoh, 1999).

La proteína ZO-1 tiene diferentes funciones en la célula, una de ellas y quizá la más importante, es darle soporte a las UE, por lo que el patrón de localización de esta proteína (panal) nos hizo suponer que esta proteína mantiene la localización de JAM-A y ocludina. Para comprobar lo anterior, decidimos silenciar la expresión de ZO-1 para determinar si la ausencia de esta proteína provoca cambios en la localización de JAM-A y de ocludina en las monocapas de células MA104.

Cómo se muestra en la Figura 10, al silenciar la expresión de ZO-1 la señal de JAM-A desaparece casi por completo de las uniones célula-célula y su abundancia se ve muy disminuida, lo cual sugiere que la proteína podría estar degradándose. Por otro lado, la ocludina (figura 10) dejó de mostrar una localización intercelular para aparecer como punteado en el citoplasma. Estas observaciones sugieren de manera importante que ZO-1 mantiene la localización tanto de JAM-A como de ocludina en células MA104 no polarizadas.



**Figura 10 . Efecto del silenciamiento de la expresión de ZO-1 sobre la localización de JAM-A y ocludina.** a) El tratamiento de células MA104 con un siRNA irrelevante (Luciferasa) no afecta la localización intercelular de JAM-A mientras que el tratamiento con un siRNA dirigido contra ZO-1 provoca que JAM-A desaparezca del espacio intercelular. b) El tratamiento de células MA104 con un siRNA irrelevante (Luciferasa) no afecta la localización intercelular de ocludina mientras que el tratamiento con un siRNA dirigido contra ZO-1 provoca que ocludina desaparezca del espacio intercelular y se observe como un puntillero citoplásmico.

Los resultados anteriores demuestran que las proteínas de UE JAM-A, ocludina y ZO-1 se expresan en células MA104 y tienen una localización similar a la que se observa para las mismas proteínas en cultivos de células polarizadas. Lo anterior no ocurre para las claudinas -14 y -16, las cuales no se localizan en el espacio intercelular. Asimismo demuestran que la proteína ZO-1 mantiene la localización intercelular de JAM-A y ocludina.

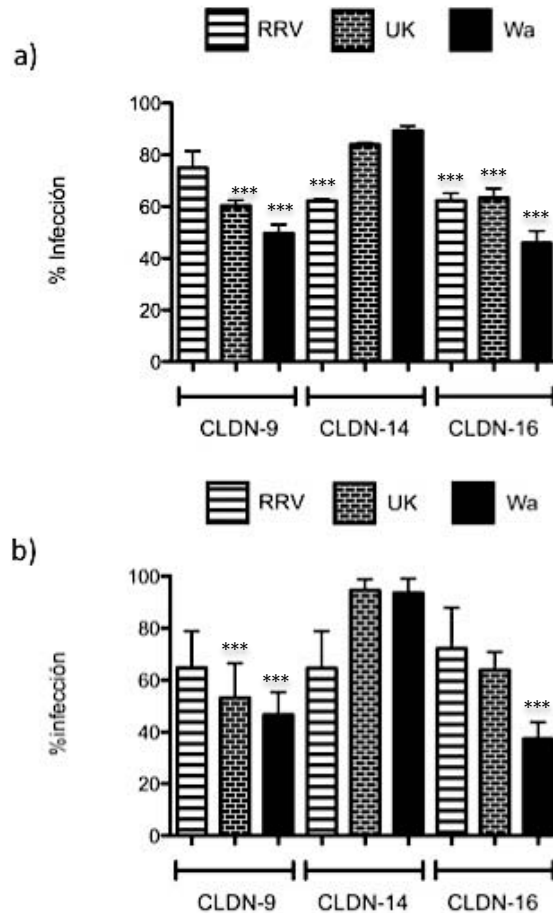
## **6.2 Diferentes cepas de rotavirus utilizan a las claudinas -9, -14 y -16 en etapas posteriores a la entrada del virus a células MA104.**

Una vez que se determinó la localización de las diferentes proteínas de UE en células MA104 no polarizadas, se decidió caracterizar el papel que tenían estas proteínas en la entrada de rotavirus de las cepas RRV (simio), UK (bovino) y Wa (humano).

Ya que la localización de las claudinas -14 y -16 no era similar a la de las demás proteínas de UE y dado el antecedente que demostró que estas dos claudinas junto con la claudina-9 son importantes para el ciclo de replicación de rotavirus (Silva-Ayala, 2013), se decidió estudiar primero a estas tres proteínas. Para lo anterior, se silenció la expresión de cada una de ellas de manera individual para determinar el efecto de dicho silenciamiento sobre el ciclo de replicación de rotavirus de las cepas ya mencionadas.

En la figura 11 se observa que el silenciamiento de la expresión de la claudina-9 disminuyó la infectividad de las tres cepas de rotavirus en diferentes grados, siendo la cepa RRV la menos afectada (aproximadamente 20% de reducción) y la cepa Wa la más afectada (aproximadamente 50% de reducción).

Por otro lado, el silenciamiento de la expresión de la claudina-14 únicamente afectó la infectividad de la cepa RRV, reduciéndola aproximadamente un 40%. Finalmente, el silenciamiento de la expresión de la claudina-16 disminuye la infectividad de las cepas RRV y UK en aproximadamente 50% y la infectividad de la cepa Wa en aproximadamente 60%.



**Figura 11 . Las claudinas -9, -14 y -16 no son indispensables para la entrada de rotavirus a células MA104.** Se transfectaron células MA104 con siRNAs contra CLDN-9, CLDN-14 y CLDN-16 utilizando un método de transfección reversa. Después de 72 horas las células se infectaron con rotavirus de las cepas RRV, UK y Wa a una MOI de 0.02. Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células tratadas con un siRNA contra luciferasa. En el panel a) se muestran los resultados del efecto del silenciamiento sobre la infección con TLPs. En el panel b) se muestran los ensayos correspondientes a las transfecciones con DLPs en células MA104 bajo las condiciones ya mencionadas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

Los resultados anteriores sugieren que las claudinas -9, y -16 son importantes para el ciclo de replicación de rotavirus de las cepas RRV, UK y Wa mientras que la claudina-14 parece ser importante sólo para el ciclo de replicación de RRV.



De manera simultánea se efectuó un ensayo de lipofección con DLPs. Estas partículas son transcripcionalmente activas y son capaces de iniciar el ciclo de replicación de rotavirus cuando se les introduce de manera artificial al citoplasma de la célula. Con este ensayo se evitan los pasos de unión y entrada llevados a cabo por los viriones maduros o TLPs; cuando el silenciamiento de la expresión de una proteína afecta la replicación viral en células transfectadas con DLPs se puede concluir que el tratamiento afecta un paso posterior a la entrada del virus.

Como se muestra en la figura 11, el silenciamiento de la expresión de las claudinas -9 y -16 disminuyó la infectividad de las tres cepas de rotavirus probadas cuando se lipofectan sus DLPs. Un efecto similar se observó con el silenciamiento de la expresión de la claudina -14 sobre la infectividad de las DLPs de la cepa RRV. Estos resultados sugieren que las claudinas no son necesarias para la entrada de rotavirus a células MA104 no polarizadas, sino en un paso posterior al ingreso del virus.

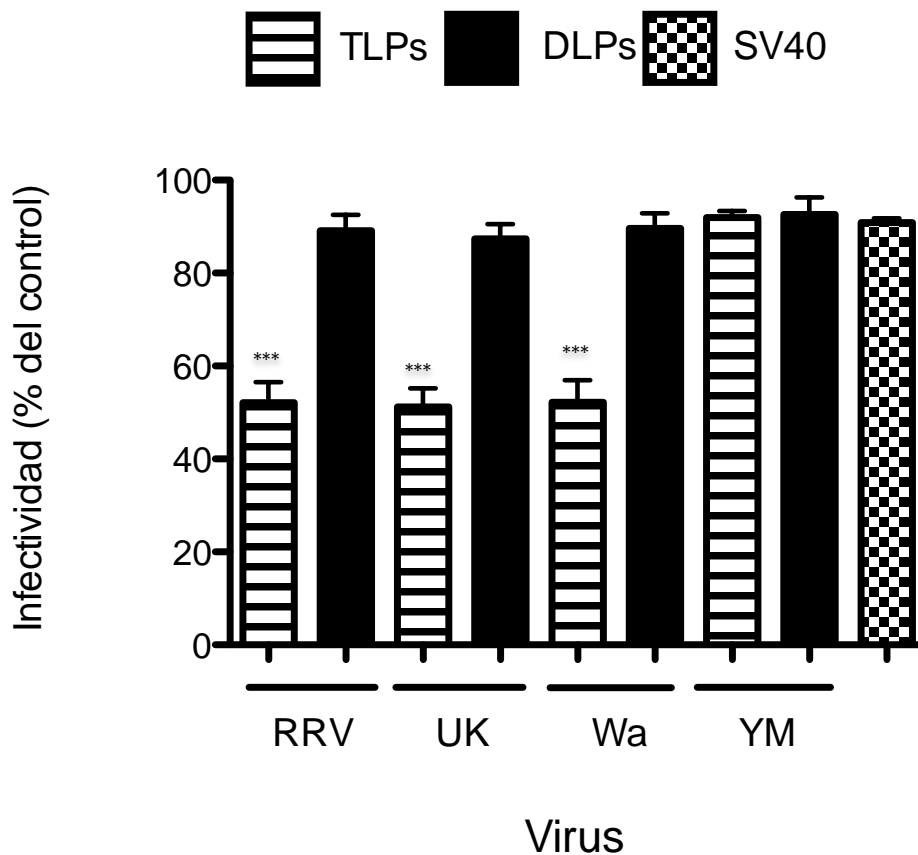
La localización intracelular de las claudinas se ha observado con mayor frecuencia en células cancerosas, sin embargo, existe poca información sobre su localización y sus funciones en células epiteliales no polarizadas. Todas las claudinas poseen un dominio intracelular de tipo PDZ, a través del cual se asocian a una gran variedad de proteínas citoplásmicas entre las que se encuentran proteínas que forman parte de las UE como ZO-1 y ZONAB. Cabe la posibilidad de que alguna de las proteínas con dominios PDZ que se asocian a las claudinas sea esencial para la replicación de rotavirus y que el silenciamiento de la expresión de las diferentes claudinas afecte de manera indirecta la expresión o la localización de dicha proteína.

### **6.3 Diferentes cepas de rotavirus utilizan proteínas de uniones estrechas durante su entrada a células MA104 no polarizadas.**

La proteína JAM-A es un conocido receptor para otro miembro de la familia *Reoviridae*, reovirus. Por lo tanto, decidimos estudiar esta proteína con mayor profundidad.

Para continuar con la caracterización del papel de las proteínas de UE en la infección por rotavirus se determinó el efecto que tenía el silenciamiento de la expresión de las proteínas JAM-A, ocludina y ZO-1 sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM. La cepa YM se agregó al estudio con el fin de determinar si cepas aisladas de diferente animales mostraban un uso diferencial de las proteínas de UE durante su entrada a células MA104.

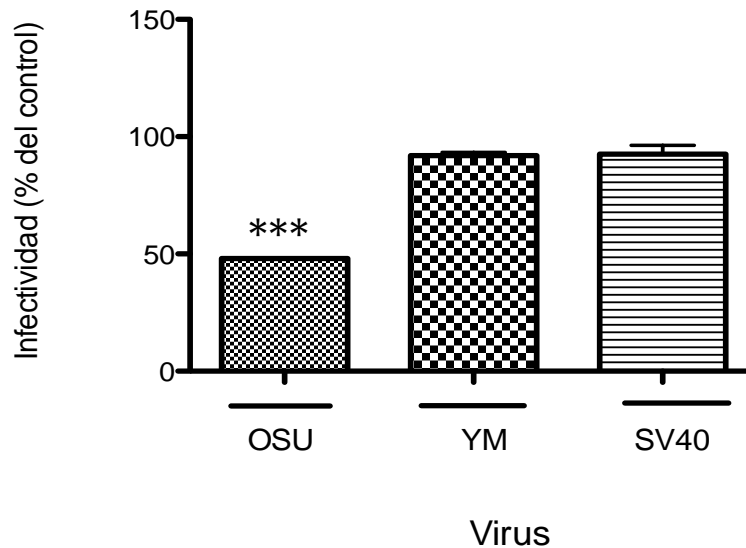
Como se muestra en la figura 12 el silenciamiento de la expresión de JAM-A disminuyó de manera significativa (aproximadamente 50%) la infectividad de todas las cepas de rotavirus probadas con excepción de la cepa YM, cuya infectividad no se vio afectada. El silenciamiento de la expresión de JAM-A no afectó la infectividad de ninguna de las cepas de rotavirus probadas cuando se inició el ciclo de replicación a partir de DLPs transfectadas, lo cual sugiere que todas las cepas, con excepción de YM, utilizan JAM-A para entrar a células MA104.



**Figura 12 . Efecto del silenciamiento de la expresión de la proteína JAM-A sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM.** Se transfecaron células MA104 con un siRNA contra JAM-A utilizando un método de transfección reversa. Después de 72 horas las células se infectaron con rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM (barras rayadas) a una MOI de 0.02, o con SV40 (barra cuadriculada). Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células tratadas con un siRNA contra luciferasa. Las barras negras representan los datos de transfección de DLPs para cada una de las cepas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de cinco experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

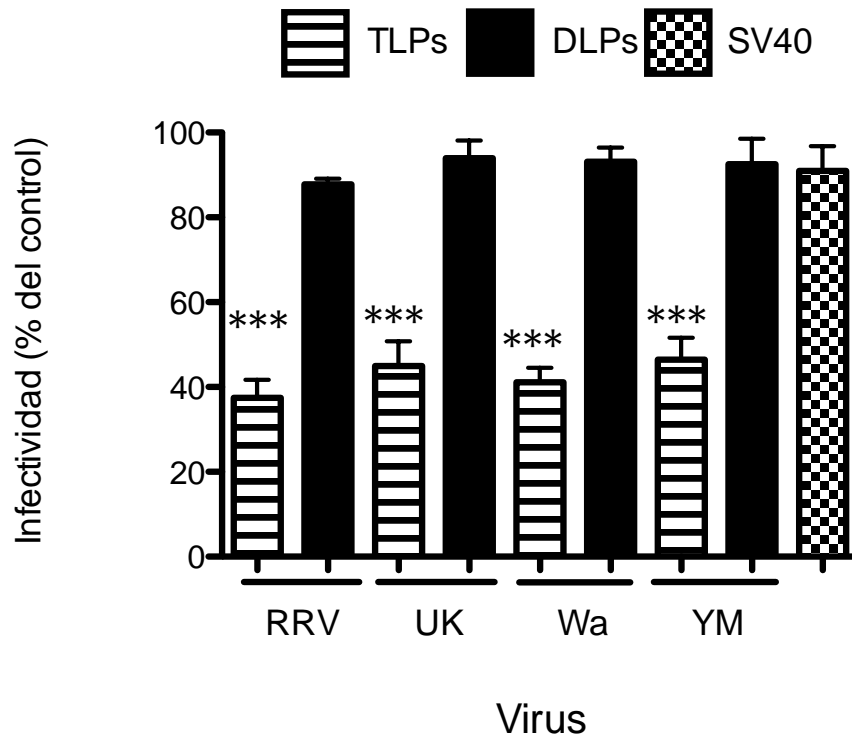
Como ya se mencionó, la cepa YM es de origen porcino y no requirió de la proteína JAM-A para entrar a células MA104. Con el fin de determinar si esto se debía al origen de la cepa y no era solo una particularidad de la misma se decidió probar la cepa OSU, la cual también es de origen porcino.

Como se muestra en la figura 13, el silenciamiento de la expresión de JAM-A disminuyó la infectividad de la cepa OSU en aproximadamente 50%, en comparación con la cepa YM cuya infectividad no se vio afectada. Estos datos permitieron concluir que el hecho de que la cepa YM no requiera de la proteína JAM-A para su entrada en células MA104 no se debe al animal de origen.



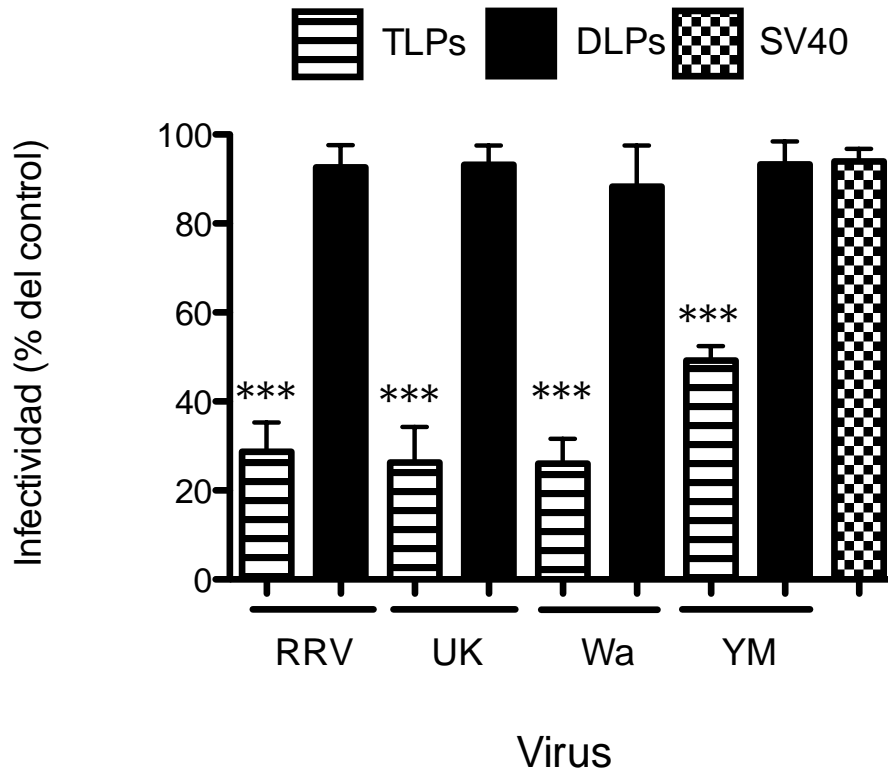
**Figura 13. Efecto del silenciamiento de la expresión de la proteína JAM-A sobre la infectividad de rotavirus de las cepas porcinas YM y OSU.** Se transfectaron células MA104 con un siRNA contra JAM-A utilizando un método de transfección reversa. Después de 72 horas las células se infectaron con rotavirus de las cepas YM y OSU a una MOI de 0.02, o con SV40. Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células MA104 tratadas con un siRNA contra luciferasa. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

Posteriormente se decidió demostrar el efecto del silenciamiento de la expresión de ocludina sobre la infectividad de rotavirus RRV, YM, UK y Wa. Como se observa en la figura 14, al silenciar la expresión de ocludina se reduce la infectividad de todas las cepas probadas de manera significativa (50-60%). La falta de inhibición al transfectar con DLPs sugiere que esta proteína es necesaria para la entrada del virus a células MA104.



**Figura 14 . Efecto del silenciamiento de la expresión de ocludina sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM.** Se transfectaron células MA104 con un siRNA contra ocludina utilizando un método de transfección reversa. Después de 72 horas, las células se infectaron con rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM (barras rayadas) a una MOI de 0.02, o con SV40 (barra cuadriculada). Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células tratadas con un siRNA contra luciferasa. Las barras negras representan los datos de transfección de DLPs para cada una de las cepas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.0001$ .

Por último, el silenciamiento de la expresión de ZO-1 (Fig. 15) provocó disminuciones significativas en la infectividad de todas las cepas de rotavirus (50%-70%), y como demuestran los datos de las transfecciones con DLPs, el silenciamiento de la expresión de esta proteína afecta la entrada del virus.



**Figura 15. Efecto del silenciamiento de la expresión de ZO-1 sobre la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM.** Se transfectaron células MA104 con un siRNA contra ZO-1 utilizando un método de transfección reversa. Después de 72 horas las células se infectaron con rotavirus de las cepas RRV, UK, Wa y YM (barras rayadas) a una MOI de 0.02, o con SV40 (barra cuadriculada). Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células tratadas con un siRNA contra luciferasa. Las barras negras representan los datos de transfección de DLPs para cada una de las cepas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

Como ya se mencionó anteriormente, la proteína ZO-1 es necesaria para la formación y el mantenimiento de las UE tanto *in vivo* como en cultivos de células polarizadas (Guillemot, 2008). Los datos previos (Figura 10) sugieren que el efecto del silenciamiento de ZO-1 sobre la infectividad de rotavirus podría ser indirecto, y que la localización intercelular tanto de JAM-A como de ocludina (mantenida por ZO-1) es necesaria para la entrada del virus.

Para demostrar que el efecto del silenciamiento de JAM-A, ocludina y ZO-1 son específicos para rotavirus decidimos utilizar como control al virus SV40, ya que hasta la fecha no se ha reportado que este virus requiera proteínas de UE para llevar a cabo su ciclo de replicación. Como se observa en las figuras 12, 14 y 15 ninguno de los tratamientos de siRNA afectó la infectividad de SV40.

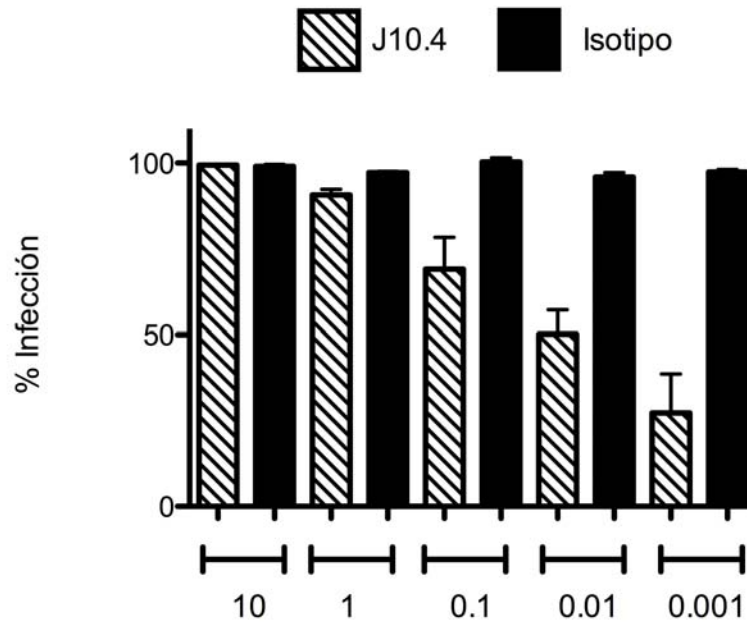
## **6.4 JAM-A actúa como co-receptor para rotavirus de las cepas RRV, UK y Wa.**

### **6.4.1 Bloqueo de la infección por rotavirus mediante el uso del anticuerpo monoclonal J10.4.**

Una de las proteínas que nos pareció más interesante para caracterizar a profundidad fue JAM-A, ya que como se sabe también funciona como receptor para reovirus, que es otro de los miembros de la familia *Reoviridae* (Barton, 2001).

Como primer enfoque se decidió estudiar la capacidad de un anticuerpo monoclonal (J10.4) dirigido contra la porción distal de la región extracelular de JAM-A para bloquear la infección por rotavirus. Así, se incubaron diferentes concentraciones de este anticuerpo directamente sobre células MA104 y se determinó la concentración a la que este anticuerpo era capaz de disminuir la infectividad de rotavirus de la cepa RRV.

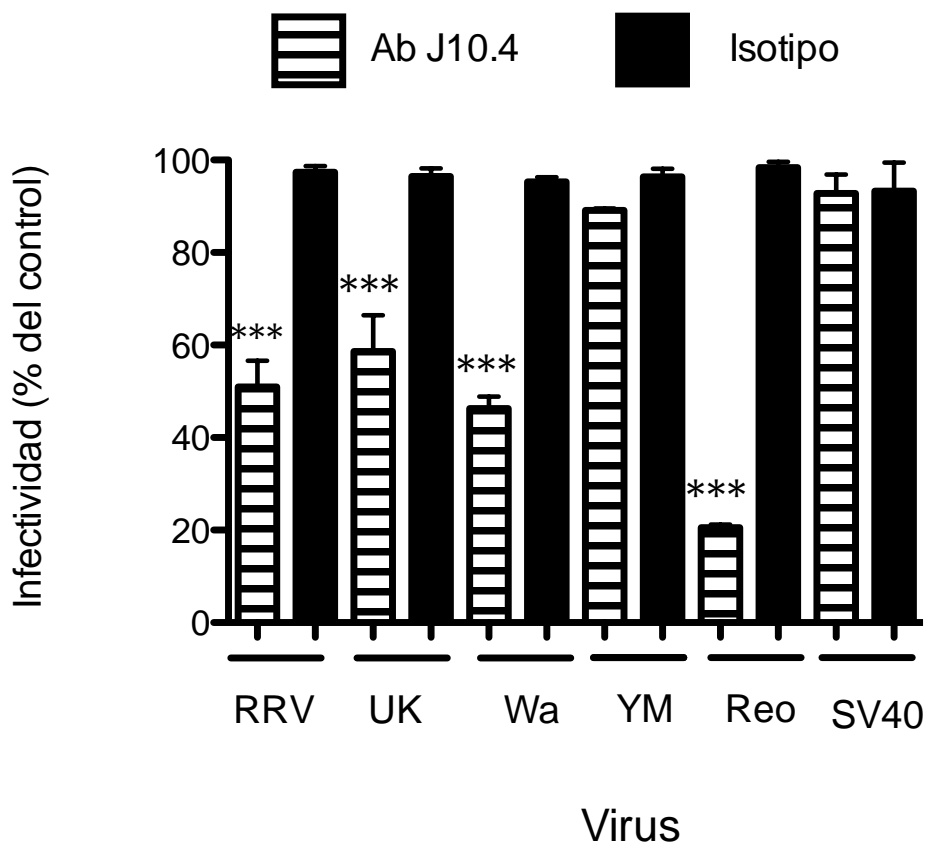
Como se muestra en la figura 16, el anticuerpo disminuyó la infectividad de rotavirus (RRV) en aproximadamente 50% cuando se utilizó a concentraciones de 1 µg/mL y 10 µg/mL. De manera interesante, la inhibición nunca fue mayor al 50%, aún a concentraciones tan altas como 10 µg/mL.



**Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de rotavirus RRV.** Diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal dirigido contra JAM-A o de un anticuerpo anti CD46 (isotipo) se incubaron sobre monocapas de células MA104 para después infectarlas con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 0.02. Después de 14 horas, las células se fijaron y se tiñeron por inmunoperoxidasa. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de dos experimentos independientes.

Una vez determinada la concentración a la cual se obtenía un 50% de disminución de la infectividad de rotavirus RRV, se procedió a estudiar el efecto del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de las cepas UK, Wa y YM (Figura 17).





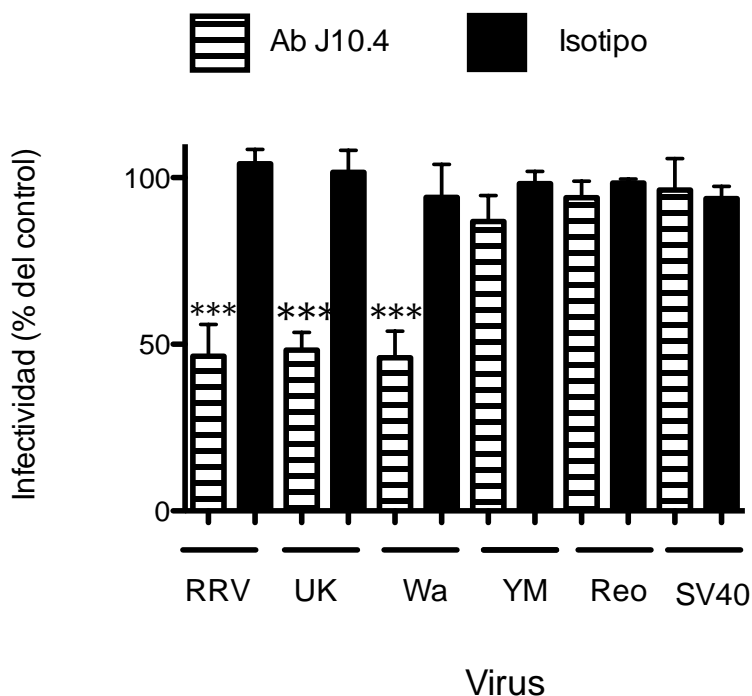
**Figura 17. Efecto del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de diferentes cepas de rotavirus y virus control.** El anticuerpo J10.4 se incubó sobre células MA104 durante 1 hora a 4°C. Después de este tiempo, las células se incubaron durante 1 hora a 4°C con virus de las diferentes cepas a una MOI de 0.02. Después del periodo de incubación, las células se pasaron a 37°C y se permitió que la infección procediera durante 14 horas. Después de este tiempo las células se tiñeron por inmunoperoxidasa para evidenciar las células infectadas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de cuatro experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

Como se muestra en la figura 17, el anticuerpo J10.4 fue capaz de disminuir la infectividad de rotavirus de las cepas RRV, UK y Wa en aproximadamente 50% a una concentración de 1 µg/mL. De manera concordante con los resultados del silenciamiento de la expresión de JAM-A (Figura 12), la infectividad de rotavirus de la cepa YM no se vió afectada por el anticuerpo J10.4.

Como control positivo se utilizó la cepa de reovirus T3D, la cual utiliza JAM-A como receptor celular. En la figura 17 se observa que a una concentración de 1 µg/mL el anticuerpo fue capaz de disminuir la infectividad de reovirus T3D en aproximadamente 90%. Por otro lado, como control negativo se escogió al virus SV40, para el cual no hay reportes de que utilice proteínas de UE durante su ciclo de replicación. Como se observa en la figura 17, la infectividad de SV40 no se afectó al tratar las células con el anticuerpo J10.4.

El primer paso de la infección por rotavirus involucra la unión del virus a la superficie celular por medio de residuos de ácido siálico, por lo que decidimos averiguar si el anticuerpo J10.4 era capaz de bloquear esta unión o si actuaba en etapas posteriores a la misma.

Para esto, se permitió que el virus se uniera a la superficie de células MA104 durante 1 hora a 4°C y posteriormente se incubó el anticuerpo a la misma temperatura también por 1 hora. Como se muestra en la figura 18, el anticuerpo J10.4 disminuyó la infectividad de todas las cepas de rotavirus empleadas (con excepción de YM) aún después del periodo de unión.

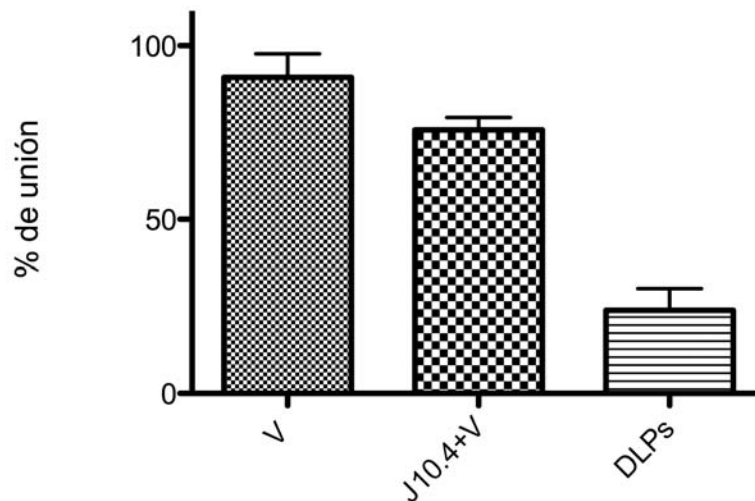


**Figura 18. Efecto post-unión del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de diferentes cepas de rotavirus y virus control.** Las diferentes cepas de rotavirus a una MOI de 0.02 se incuban sobre células MA104 durante 1 hora a 4°C para permitir la unión del virus a la superficie celular. Pasado este tiempo se añade el anticuerpo J10.4 y se incuba sobre las células durante 1 hora a 4°C. Después de este tiempo, las células se pasan a 37°C y se permite que la infección proceda durante 14 horas. Después de este tiempo las células se tiñen por inmunoperoxidasa para evidenciar las células infectadas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

La cepa de reovirus T3D se une directamente a JAM-A, por lo que al agregar el anticuerpo después del periodo de unión, la infectividad del virus no se afecta. De nuevo se utilizó al virus SV40 como control, observándose un efecto similar al del ensayo anterior (Figura 18).

Con el fin de complementar el ensayo anterior, se llevó a cabo un ensayo de unión (Zárate, 2003) sobre células previamente tratadas con el anticuerpo J10.4. Como se muestra en la figura 19, el anticuerpo J10.4 no disminuyó de manera

significativa la unión de TLPs de RRV purificadas a la superficie de células MA104. Como control se utilizaron DLPs, las cuales no se unen a JAM-A; como se observa en la figura, las DLPs no se unen a la superficie celular de manera significativa.

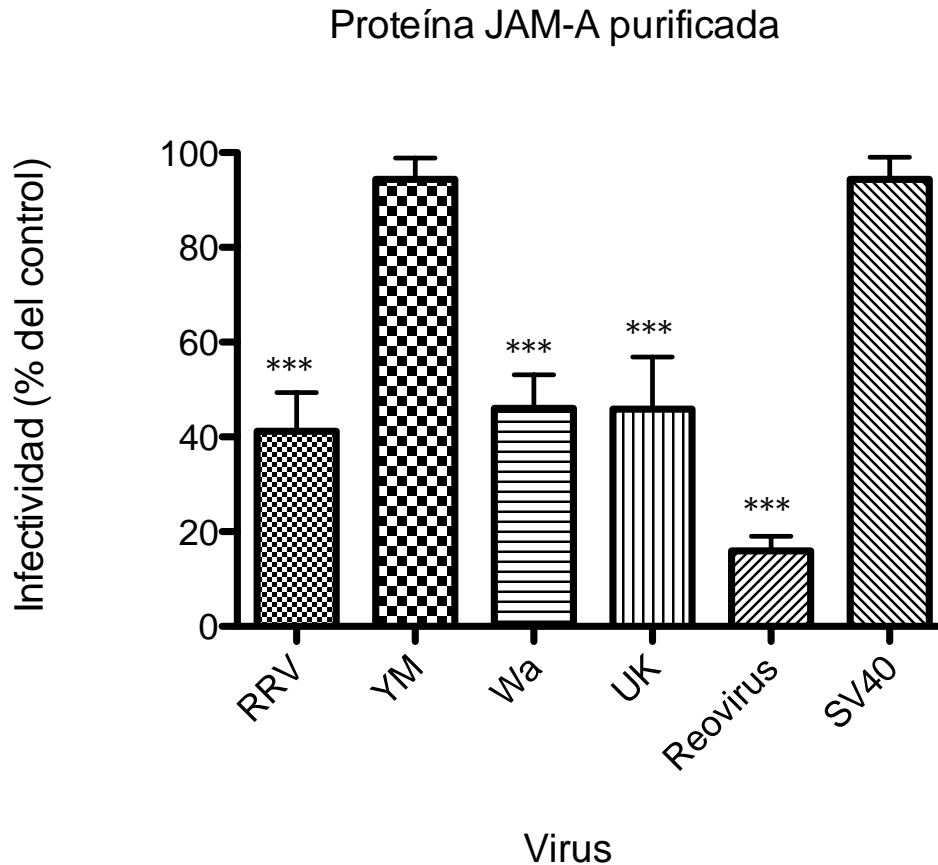


**Figura 20. Efecto del anticuerpo J10.4 sobre la unión de rotavirus RRV.** Se incubaron células MA104 con el anticuerpo J10.4 por 1 hora a 4°C y después se incubaron con 500 ng de TLPs de RRV purificadas mediante gradientes de CsCl. Después de esta incubación se lavó el virus que no se unió utilizando PBS frío y se determinó el virus unido mediante un ELISA. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de dos experimentos independientes.

### 6.3.2 Bloqueo de la infectividad de rotavirus utilizando JAM-A purificada.

Una vez que demostramos que el anticuerpo monoclonal J10.4 es capaz de bloquear la infección por rotavirus pero no su unión, decidimos evaluar si la forma soluble de JAM-A también era capaz de hacer lo mismo. Para esto, se incubaron partículas virales purificadas con la proteína JAM-A y posteriormente se infectaron monocapas de células MA104 con estas partículas. En la figura 21 se observa que la incubación de JAM-A purificada con TLPs de las cepas RRV, UK y Wa provoca una disminución de aproximadamente 60% en la infectividad de las tres cepas de rotavirus mencionadas. Esto sugiere que rotavirus podría interactuar con JAM-A y

que esta interacción es importante durante la entrada del virus. Así, estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos para el silenciamiento de JAM-A y para el bloqueo con el anticuerpo monoclonal J10.4.



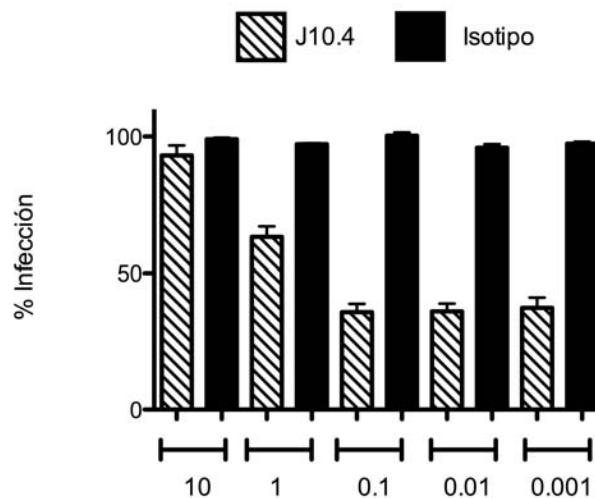
**Figura 21. Efecto de la incubación de la proteína JAM-A con TLPs de diferentes cepas de rotavirus.** La proteína JAM-A purificada a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se incubó con el virus indicado por 1 hora a 4°C y posteriormente se infectaron células MA104 con el virus tratado. 14 hora post infección las células se fijaron y se tñeron mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.0001$ .

De nuevo, la infectividad de la cepa YM no se afecta por el tratamiento con la proteína JAM-A purificada. Esto claramente sugiere que la cepa de rotavirus YM no requiere a JAM-A durante su proceso de entrada. Por otro lado, la cepa de

reovirus T3D, utilizada como control, mostró una disminución en su infectividad de aproximadamente 80% cuando se tratan partículas virales con la proteína JAM-A, mientras que el virus SV40 no sufrió cambios en su infectividad con dicho tratamiento.

#### 6.4 Rotavirus de la cepa RRV requiere JAM-A para su entrada a células intestinales.

La línea celular MA104 se deriva de riñón de mono. Ya que las células blanco de rotavirus en una infección natural son los enterocitos maduros del intestino delgado, se decidió comprobar si la proteína JAM-A era necesaria para la entrada de rotavirus a células intestinales. Desafortunadamente no existen líneas celulares establecidas derivadas de enterocitos del intestino delgado, por lo que se empleó la línea celular Caco-2, derivada de carcinoma colorrectal humano, como un modelo más cercano a las células blanco naturales.

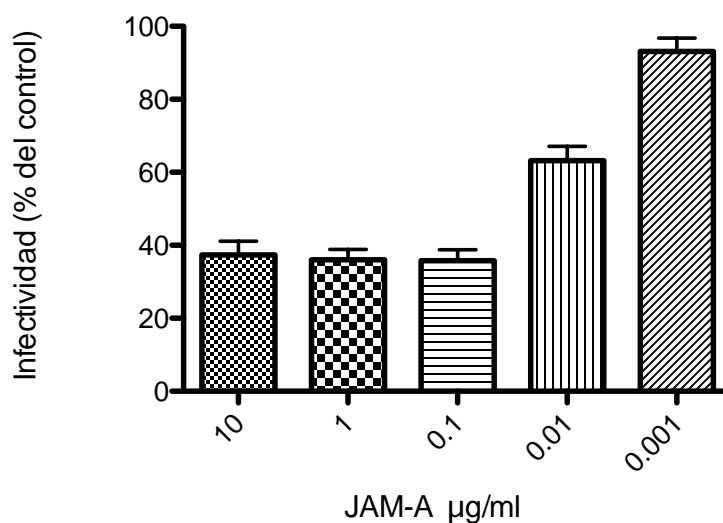


**Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones del anticuerpo J10.4 sobre la infectividad de rotavirus RRV en células Caco-2.** Diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal dirigido contra JAM-A se incubaron sobre monocapas de células Caco-2 para después infectarlas con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 0.02. Después de 14 horas, las células se fijaron y se

tiñeron por inmunoperoxidasa. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de dos experimentos independientes.

Se realizaron curvas de concentración tanto para el anticuerpo J10.4 como para la proteína JAM-A purificada (figura 22). Como se muestra en la figura 22, el tratamiento de las células Caco-2 con una concentración del anticuerpo J10.4 de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  provocó una disminución en la infectividad del virus de aproximadamente 50%.

Al preincubar TLPs de RRV con una concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la proteína JAM-A purificada se observó una disminución en la infectividad del virus de aproximadamente 50%. Los datos anteriores sugieren que en células intestinales, la proteína JAM-A es necesaria para la entrada del virus.



**Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína JAM-A soluble sobre la infectividad de rotavirus RRV en células Caco-2.** Diferentes concentraciones JAM-A soluble se incubaron durante 1 hora a 4°C con la cantidad necesaria de partículas purificadas de rotavirus RRV para infectar un cultivo a una MOI de 0.02. Después de este tiempo dichas partículas se utilizaron para infectar monocapas de células Caco-2 para durante 1 hora a 4°C. Después de 14

horas, las células se fijaron y se tiñeron por inmunoperoxidasa. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes.

## **6.5 La sobreexpresión de JAM-A en células L las vuelve sensibles a la infección por rotavirus.**

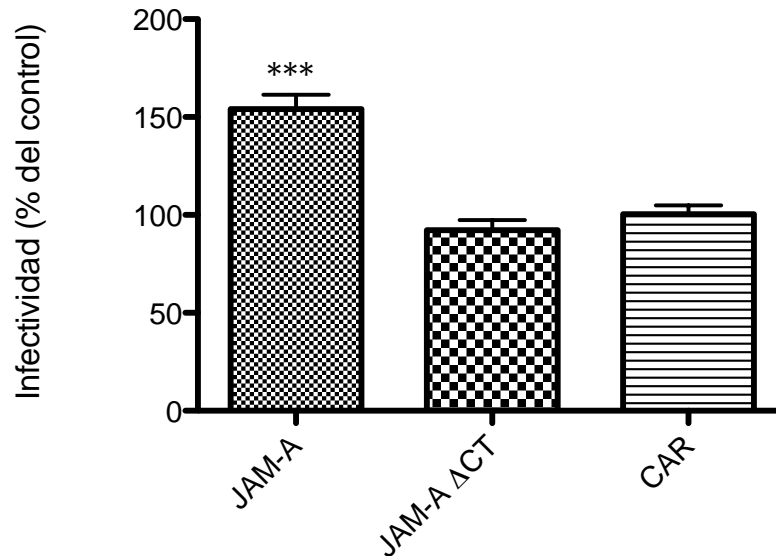
Otra manera de demostrar si una proteína puede funcionar como receptor para un virus es mediante su expresión en células que carecen de dicha proteína y que a su vez son menos sensibles a la infección por ese virus. Para esto, escogimos una línea celular de fibroblastos de ratón (células L929), la cual es 100 veces menos susceptible a la infección por rotavirus que las células MA104.

Para estos experimentos se escogieron tres construcciones distintas, la primera expresa la forma silvestre de JAM-A (JAM-A), la segunda expresa una mutante de JAM-A que tiene una delección en el extremo carboxilo terminal, es decir, no tiene cola citoplásmica (JAM-A  $\Delta$ CT) y la tercera es una construcción que expresa la proteína CAR, la cual es estructuralmente parecida a la proteína JAM-A y funciona como receptor para adenovirus 2 y 5 y coxsackievirus del grupo B. Cada una de las construcciones se sobreexpresó de manera individual en células L929, obteniéndose una eficiencia de transfección de aproximadamente 50% para cada una. Como se muestra en la figura 24, la sobreexpresión de JAM-A silvestre provocó un aumento en la infectividad de rotavirus RRV de aproximadamente 50%. La sobreexpresión de la mutante JAM-A  $\Delta$ CT no provocó un aumento en la infectividad del virus.

Para demostrar que el virus utiliza JAM-A de manera específica se sobreexpresó la proteína CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor), la cual, cómo ya se mencionó, está relacionada estructuralmente con JAM-A. Como se observa en la



Figura 24, la sobreexpresión de CAR no aumentó la infectividad del virus, demostrando así que el virus utiliza JAM-A de manera específica.



**Figura 24. Efecto de la sobreexpresión en células L de JAM-A, JAM-A DCT y CAR sobre la infección por rotavirus RRV.** Se transfectaron fibroblastos de ratón L929 con plásmidos que codifican una versión silvestre o mutante ( $\Delta$ CT) de JAM-A, o con un plásmido que codifica la proteína CAR silvestre. 48 horas post transfección, se infectaron las células con 2000 FFUs de rotavirus de la cepa RRV por pozo. La infectividad en las células que expresan las proteínas indicadas se obtuvo normalizando contra la infectividad observada en las células no transfectadas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias aritméticas de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.0001$ .

Juntos, estos resultados sugieren que la presencia de JAM-A en la membrana celular vuelve a las células L929 más susceptibles a la infección por rotavirus y, que a su vez, la cola citoplásmica de la proteína es importante para la entrada del virus, posiblemente debido a algún proceso de señalización asociado a esta porción de JAM-A.

## 6.6 La proteína VP4 define el requerimiento de JAM-A durante la entrada de rotavirus a células MA104.

Al observar diferencias en el uso de JAM-A por parte de las cepas RRV y YM, decidimos determinar si esto se debía a alguna de las proteínas virales de la capa externa (VP4 y VP7) para lo cual utilizamos un panel de rearreglantes RRV x YM obtenidos en nuestro laboratorio. Los virus rearreglantes son virus quiméricos que se producen cuando se infecta una misma célula con dos rotavirus distintos (parentales). Las partículas virales que se obtienen de esta co-infección poseen un genoma formado por una mezcla de genes provenientes de ambas cepas parentales. En la tabla 1 se pueden observar las características de los virus rearreglantes empleados.

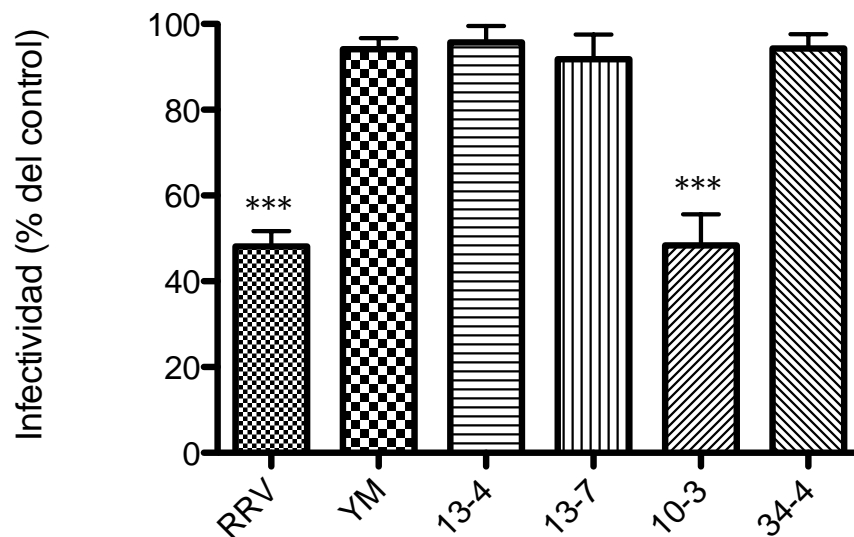
**Tabla 1. Origen de las proteínas estructurales de los rearreglantes RRV x YM utilizados en este trabajo.**

Virus	Origen del gen que codifica por la proteína indicada					
	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7
YM	Y	Y	Y	Y	Y	Y
RRV	R	R	R	R	R	R
<b>Rearreglantes YM x RRV</b>						
13-4	R	R	R	Y	R	R
13-7	R	R	R	Y	R	Y
10-3	R	R	Y	R	R	R
34-4	Y	Y	Y	Y	Y	R

Como se puede ver en la tabla 1, el virus rearreglante 13-4 posee todas las proteínas estructurales de RRV salvo VP4, que pertenece a YM. El rearreglante 13-7 tiene la VP4 y VP7 de YM y el resto de las proteínas estructurales pertenecen

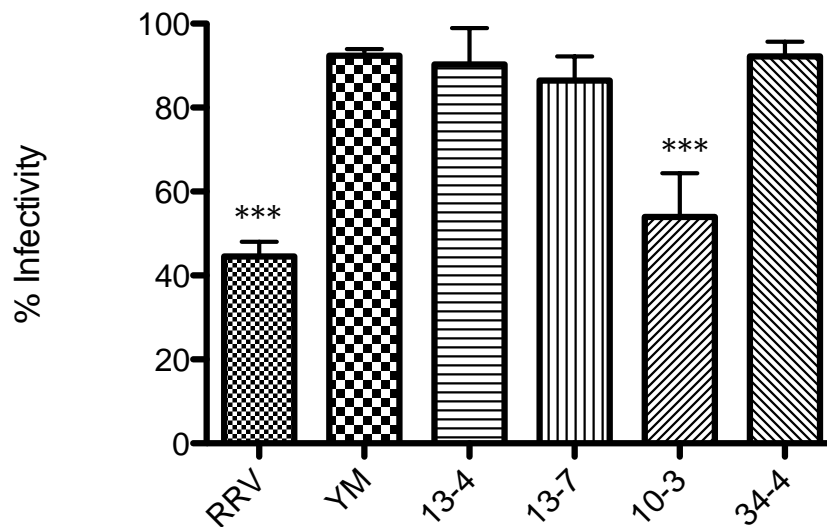
a RRV. El virus rearreglante 10-3 posee la VP3 de YM y el resto de las proteínas estructurales de RRV y por último, el rearreglante 34-4 posee la VP7 de RRV y el resto de las proteínas estructurales de YM.

En principio, decidimos silenciar la expresión de JAM-A para determinar el efecto que tenía dicho silenciamiento sobre la infectividad tanto de las cepas parentales como de los diferentes rearreglantes. Como se muestra en la figura 25, los rearreglantes 13-4, 13-7 y 34-4 mostraron el mismo fenotipo que la cepa parental de YM. Todas las cepas anteriores tienen en común la VP4 de YM. Por otro lado, la rearreglante 10-3, que posee la VP4 de RRV, mostró un fenotipo similar al de la cepa parental de RRV.



**Figura 25. Efecto del silenciamiento de la proteína JAM-A sobre la infectividad de diferentes rearreglantes RRv x YM.** Se transfectaron células MA104 con un siRNA contra JAM-A y se infectaron con los diferentes rearreglantes a una MOI de 0.02 A las 14 horas post infección se fijaron las células y se tiñeron por inmunoperoxidasa. Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células tratadas con un siRNA irrelevante. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001.

Los resultados anteriores se corroboraron utilizando el anticuerpo J10.4 para bloquear la infección del virus. Como se muestra en la figura 26 los virus rearreglantes 13-4, 13-7 y 34-4 muestran el mismo fenotipo que la cepa parental de RRv. Todas las cepas anteriores tienen en común la VP4 de YM. Por otro lado, el rearreglante 10-3 muestra un fenotipo similar al de la cepa parental de RRv, este rearreglante posee la VP4 de RRv. Los resultados anteriores sugieren de manera importante que la proteína estructural del virus involucrada en el reconocimiento a JAM-A es la proteína VP4.

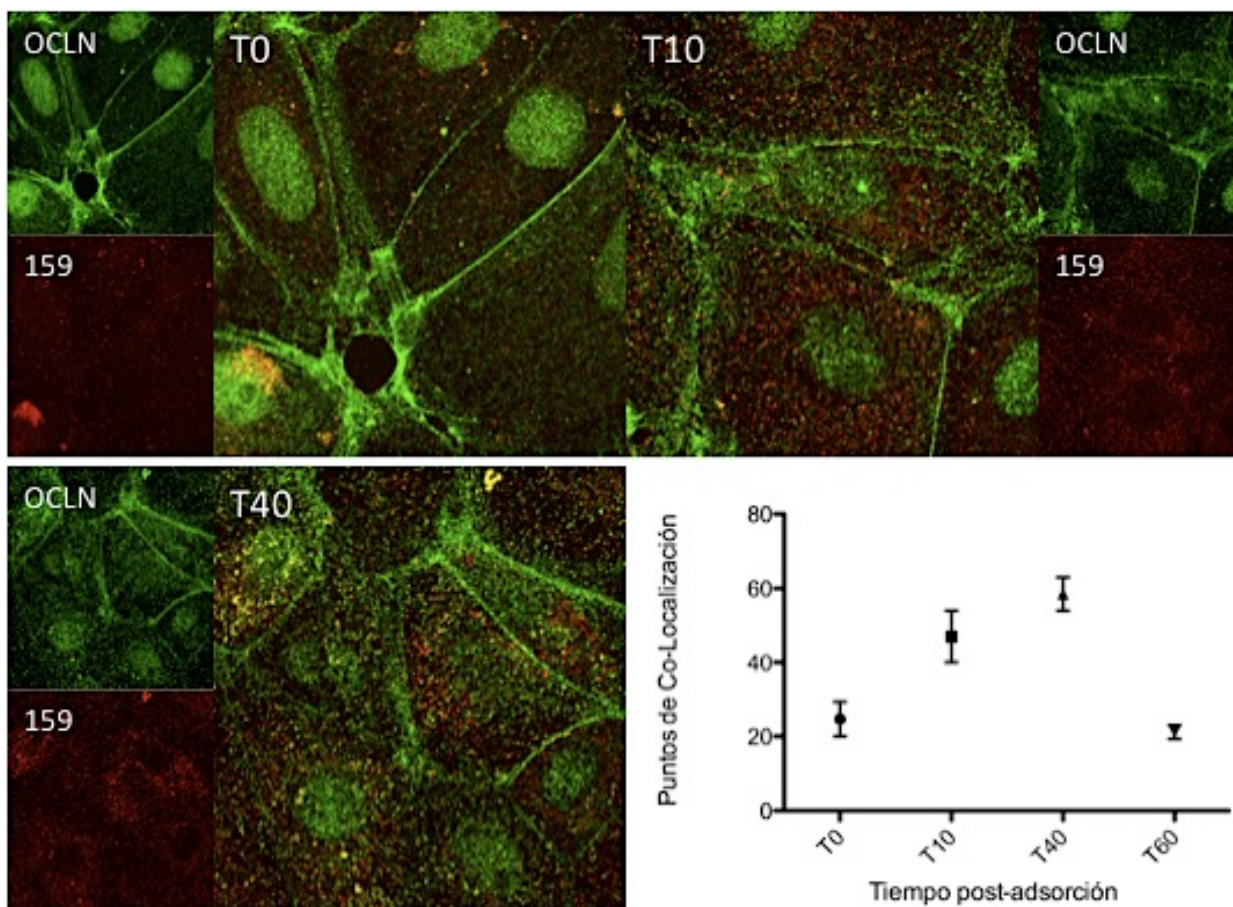


**Figura 26. Efecto del anticuerpo monoclonal J10.4 sobre la infectividad de diferentes rearreglantes RRv x YM.** El anticuerpo J10.4 se incubó sobre células MA104 durante 1 hora a 4°C. Después de este tiempo, las células se incubaron durante 1 hora a 4°C con virus de las diferentes cepas a una MOI de 0.02. Después del periodo de incubación, las células se pasaron a 37°C y se permitió que la infección procediera durante 14 horas. Después de este tiempo las células se tiñeron por inmunoperoxidasa para evidenciar las células infectadas. Los datos se normalizaron contra la infectividad de cada virus en células incubadas con un anticuerpo control de isotipo (CD46). Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. \*\*\*P<0.0001..

## **6.8 Las partículas virales de rotavirus co-localizan con ocludina a tiempos tempranos de la infección.**

Ya que se demostró que la ocludina es importante para la entrada de rotavirus a células MA104, decidimos determinar si existía co-localización entre las partículas virales y la ocludina en tiempos tempranos de la infección, con el fin de determinar si existe la posibilidad de que el virus interactúe con la ocludina durante su entrada.

Para esto realizamos co-localizaciones entre las partículas virales y la ocludina mediante ensayos de microscopía confocal (Figura 27). Para detectar las partículas virales se utilizó el anticuerpo monoclonal C159, el cual únicamente identifica a la proteína VP7 cuando ésta se encuentra ensamblada en la superficie de los viriones maduros. Por otro lado, para detectar a la ocludina se empleó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la porción citoplásmica C-terminal de esta proteína. Como se muestra en la figura 27, los eventos de co-localización inician desde el tiempo 0, lo que sugiere que el virus se asocia con la ocludina presente en la superficie de la célula.



**Figura 27. Rotavirus co-localiza con occludina en tiempos tempranos de la infección.** a) La occludina se co-localizó con partículas de RRV a distintos tiempos post-unión. b) cuantificación del porcentaje de co-localización. Se incubaron células MA104 con partículas purificadas de rotavirus de la cepa RRV (MOI 50) durante una hora a 4°C y posteriormente se adicionó MEM a 37°C para permitir la internalización del virus. Para detectar a la occludina (verde) se utilizó un anticuerpo monoclonal (Life Technologies) dirigido contra la porción C-terminal de esta proteína (citoplásmica). El virus (rojo) se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP7 (C159). La co-localización de las partículas virales y occludina se visualizó utilizando un microscopio confocal Bio-Rad MRC acoplado a una cámara Axiophot (Zeiss). Cada ensayo de co-localización se hizo por duplicado y se seleccionaron 5 células al azar por punto de tiempo en el experimento. Dichas células se analizaron con el software ImageJ 1.45 S utilizando un plugin de colocalización y la se cuantificaron todos aquellos puntos de co-localización que estuvieran entre 0.03 y 1.3  $\mu\text{m}^2$ . Se muestran imágenes representativas. Escala =5 $\mu\text{m}$ .

La co-localización aumentó a los 10 minutos y alcanzó un máximo en el minuto 40, para después disminuir entre el minuto 40 y el 60. Como ya se reportó (Silva-Ayala, 2013), las partículas virales se desnudan en algún momento entre el minuto 40 y el minuto 60, con lo cual la señal del anticuerpo C159 se pierde, lo cual es consistente con los datos obtenidos.

Los resultados anteriores sugieren que la ocludina podría funcionar como receptor o correceptor para rotavirus y endocitarse junto con las partículas virales durante el proceso de entrada del virus a células MA104.

## 7. Discusión

El proceso de entrada de los rotavirus a su célula hospedera es sumamente complejo, e involucra una serie de pasos secuenciales en los que diversos receptores, como gangliósidos e integrinas, juegan un papel muy importante (Isa, 2006; Martínez, 2013; Zárate, 2000; Hewish, 2000). La mayoría de los receptores que se han caracterizado para rotavirus se describieron utilizando como modelo de estudio la línea celular MA104, la cual deriva de epitelio de riñón de mono. Esta línea celular es altamente permisiva a la infección por rotavirus. Sin embargo, los enterocitos maduros que recubren las microvellosidades del intestino delgado, son las células más susceptibles a la infección por rotavirus *in vivo* (Ramig, 2004).

De manera interesante, en el epitelio intestinal, al igual que en otros epitelios, los receptores que se han caracterizado para rotavirus en células MA104 se ubican en diferentes dominios membranales de las células polarizadas que los constituyen. Así, los glicanos que definen el grupo sanguíneo, al igual que los distintos tipos de gangliósidos que contienen los residuos de ácido siálico, y que son requeridos por las partículas virales para adsorberse a la superficie celular, suelen ubicarse en la cara apical de los enterocitos, orientados hacia el lumen del intestino (Yu, 2011). Lo anterior resulta sumamente conveniente para las partículas virales que penetran al organismo a través de la ruta oral ya que una vez que alcanzan el intestino delgado, tienen todas las condiciones necesarias para adsorberse a la superficie de las células entéricas e iniciar el proceso de infección.

Los datos que se tienen sobre la entrada de algunas cepas de rotavirus muestran que después de la unión virus-glicano, la partícula viral interacciona con diferentes tipos de integrinas (Zárate, 2000; Hewish, 2000; Zárate, 2004; Graham, 2003). Sin embargo, en el epitelio intestinal las integrinas se ubican preferentemente en el



dominio basolateral de los enterocitos, por debajo de las uniones estrechas. Lo anterior sugiere que las integrinas no son accesibles para las partículas virales que potencialmente se adsorben a los gangliósidos o antígenos de grupos sanguíneos ubicados en la cara apical de los enterocitos. Para llegar a dichas integrinas y continuar la cascada de eventos necesaria para la entrada de las partículas virales al citoplasma, las partículas de rotavirus tendrían que atravesar el espacio paracelular, el cual se mantiene cerrado por la presencia de las uniones estrechas (UE).

Anteriormente se describió que la proteína viral VP8\* es capaz de abrir las UE, lo cual en teoría permitiría que las partículas virales atravesaran el espacio paracelular para alcanzar a las integrinas (Nava, 2004). Sin embargo, esto se observó utilizando VP8 purificada y no se ha observado el mismo efecto utilizando partículas virales completas. Por lo tanto, la manera en la que las partículas de rotavirus pudieran llegar desde los glicanos ubicados en la cara apical de los enterocitos hasta las integrinas ubicadas en la cara basolateral sigue siendo un misterio.

En un antecedente previo a este trabajo se demostró que en monocapas de células MA104 las proteínas de uniones estrechas JAM-A, claudina-9, claudina-14 y claudina-16 son importantes durante la entrada de rotavirus de la cepa RRV a dichas células (Silva-Ayala, 2013). Esto sugiere que las UE están involucradas en la entrada de rotavirus, lo cual podría explicar los eventos que ocurren después de que las partículas virales reconocen los glicanos en la superficie celular. Dado este antecedente, escogimos como modelo de estudio a la línea celular MA104.

En cultivos de células polarizadas, las proteínas de UE se ubican en el espacio intercelular, mostrando un patrón de “panal” característico, el cual se observó

también para las proteínas JAM-A, ocludina y ZO-1 en las monocapas de células MA104. Sin embargo, las claudinas -14 y -16 mostraron una distribución citoplásmica. La polarización celular y el transporte de iones a través del espacio paracelular dependen en gran medida de la expresión y la localización de las distintas claudinas (Van Itallie, 2006). Sin embargo, en nuestro modelo de estudio, las claudinas mostraron un patrón de distribución intracelular, lo que podría explicar por qué las monocapas de células MA104 no exhiben características propias de las células polarizadas. Este patrón intracelular sólo se había observado previamente en células renales y del epitelio respiratorio para la Claudina-7 (Li, 2004; Lu, 2011). Una posible explicación para la localización citoplásmica de las claudinas es que éstas son capaces de regular procesos celulares distintos al transporte de iones, sin embargo, esto no se ha demostrado a la fecha.

La otra posibilidad que existe para explicar la localización citoplásmica de las claudinas en las células MA104 implicaría considerar que la localización de JAM-A, ocludina y ZO-1 en el espacio intercelular representa una UE en formación, como se ha observado en otros modelos celulares (Shin, 2006). Así, cabría la posibilidad de que las claudinas se acumulen en citoplasma hasta que tengan los estímulos necesarios para ubicarse en las UE.

La posibilidad de que las claudinas regulen procesos distintos al transporte de iones a través del espacio paracelular parece factible si se consideran los datos obtenidos al investigar el efecto del silenciamiento de la expresión las distintas claudinas sobre la infección por rotavirus. Nuestros datos claramente demuestran que las diferentes claudinas (-9, -14 y -16) son importantes para el ciclo de replicación de distintas cepas de rotavirus en etapas posteriores a la entrada, por lo menos, en células MA104. Esto implicaría que dichas claudinas están regulando

algún proceso necesario para la replicación o la salida de las partículas virales recién formadas. Estudiar este fenómeno podría ampliar el conocimiento que se tienen tanto del ciclo de replicación de rotavirus como del papel que juegan las claudinas en la regulación de diferentes procesos intracelulares.

Dado nuestro interés en explicar el papel de las UE en la entrada de rotavirus, decidimos caracterizar con mayor profundidad el papel de las proteínas JAM-A, ocludina y ZO-1 en la entrada de estos virus. Al silenciar la expresión de las proteínas ya mencionadas pudimos demostrar que todas están involucradas en la entrada de las partículas virales al citoplasma celular. Sorprendentemente, el silenciamiento de la expresión de la proteína ZO-1 produjo las mayores disminuciones de infectividad en todas las cepas de rotavirus que se probaron.

El silenciamiento de ZO-1 afectó la entrada de las partículas virales al citoplasma celular, según demostraron nuestros estudios de transfección de DLPs. Esto puede explicarse fácilmente si se toma en cuenta que la proteína ZO-1 regula el transporte de varias proteínas de UE (entre ellas JAM-A y ocludina) a la membrana celular. Al silenciar la expresión de esta proteína se observó un cambio importante en la localización de JAM-A y ocludina, las cuales desaparecieron del espacio intercelular bajo estas condiciones. Este dato nos permite hipotetizar que la proteína ZO-1 es importante para la entrada de rotavirus a células MA104 debido a que transporta y mantiene a las proteínas de uniones estrechas JAM-A y ocludina en la membrana celular.

De ser cierta esta hipótesis, la ausencia de ZO-1 evitaría que JAM-A y ocludina funcionaran como receptores o co-receptores para las partículas virales. Como ya se mencionó, el silenciamiento de la expresión de ZO-1 es el que afectó en mayor medida la infectividad del virus. Los silenciamientos individuales de la expresión

de JAM-A y de ocludina no produjeron una disminución de infectividad comparable con la del silenciamiento de ZO-1. Esto puede implicar que hay más de una proteína asociada a ZO-1 que es importante para la entrada de rotavirus, y que la proteína ZO-1 mantiene a todas estas proteínas juntas en la membrana de las células MA104.

Recientemente se ha descrito el proceso de entrada de los rotavirus a células MA104. Por varios trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio se sabe que diferentes cepas de rotavirus entran a estas células por vías endocíticas distintas; la cepa RRV entra a la célula mediante un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina, mientras que las cepas YM, UK y Wa lo hacen mediante endocitosis dependiente de clatrina (Diaz-Salinas, 2013; Silva-Ayala, 2013).

En muchos casos la vía endocítica utilizada por un virus para entrar a su célula hospedera está dictada por los receptores o co-receptores que utiliza, tal como se ha observado para el virus de influenza (De Vries, 2011). Sin embargo, en el caso de rotavirus se ha observado que el receptor (molécula celular a la cual se une inicialmente el virus) no define la vía endocítica utilizada por el virus (Diaz-Salinas, 2013).

Este es el caso para JAM-A, el cual según los resultados presentados en este trabajo tampoco parecen definir la vía endocítica que utilizan los rotavirus para entrar a su célula hospedera. La proteína JAM-A actúa como co-receptor celular para reovirus, otro miembro de la familia *Reoviridae*. El hecho de que todas las cepas de rotavirus que probamos (salvo la cepa YM) requieran esta proteína para su entrada a células MA104 podría implicar que existen moléculas con funciones conservadas de receptor o co-receptor para los virus de esta familia. Es posible que esta proteína actúe como co-receptor para las partículas virales en etapas posteriores a la adsorción del virus a glicanos según lo muestran nuestros

resultados. La proteína JAM-A podría ser por lo tanto, un co-receptor utilizado por los rotavirus antes de unirse en etapas previas a la entrada.

Este mecanismo ya se ha descrito para adenovirus, el cual utiliza a la proteína de uniones estrechas CAR como co-receptor durante su entrada. En el caso de adenovirus, la unión con CAR permite que las partículas en la superficie celular accedan a diferentes integrinas, las cuales actúan como co-receptor también y son internalizadas junto con las partículas virales hacia el citoplasma celular (Amberg, 2012). Posiblemente, al ser también virus que infectan epitelios, los rotavirus lleven a cabo un proceso de entrada similar, en el cual la unión del virus con JAM-A representa un paso previo a la unión del virus con alguna molécula de membrana que sea capaz de inducir la penetración del virus.

En este trabajo se identificaron dos dominios de la proteína JAM-A que parecen ser importantes para la entrada de rotavirus:

1. La porción distal del dominio extracelular de JAM-A, la cual es el sitio de reconocimiento del anticuerpo J10.4 contra JAM-A que fue capaz de bloquear la infección por rotavirus.
2. La porción citoplásmica de la proteína JAM-A, la cual fue importante para aumentar la sensibilidad de las células L a la infección por rotavirus.

La porción extracelular de JAM-A probablemente es el sitio en el que se da la interacción entre dicha proteína y las partículas virales. Esta interacción fue mediada por la proteína viral VP4 según demostraron nuestros experimentos con virus rearreglantes RRV x YM.

Por otro lado, la porción citoplásmica de JAM-A podría ser necesaria para la entrada del rotavirus debido a que es una región importante a la que se unen diversas proteínas citoplásmicas involucradas en procesos de señalización. Esto sugiere que alguna vía de transducción de señales mediada por JAM-A es necesaria para la entrada de rotavirus. Algunos mecanismos de señalización previamente asociados con la entrada de reovirus incluyen la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa A (PKA) y la cinasa Abl entre otras (Dunn, 2012). De estas últimas moléculas PI3K y PKA se han relacionado previamente con procesos de señalización mediados por JAM-A (Nava, 2011).

De manera interesante, encontramos que el origen animal de las cepas no define el uso de JAM-A como co-receptor. La cepa porcina YM fue la única de las evaluadas que no requirió JAM-A como co-receptor. Esto podría ser una particularidad de dicha cepa, ya que otra cepa porcina, OSU, si utilizó JAM-A como co-receptor. Posiblemente los cambios de aminoácidos entre la VP4 de todas las cepas evaluadas y la de YM, podrían ser los responsables de las diferencias observadas en el uso de JAM-A como co-receptor.

Otro dato relevante obtenido en este trabajo es que la proteína JAM-A parece ser necesaria para la entrada de rotavirus no solo en células de origen renal sino también en células de origen intestinal, tal como se observó en la línea celular Caco-2. Esto sugiere que en el intestino la proteína JAM-A podría servir como co-receptor para rotavirus. JAM-A no es indispensable para la replicación de reovirus en células de origen intestinal ni para su replicación en neuronas, sin embargo, es indispensable para su diseminación sistémica (Antar, 2009). Sería importante estudiar también si los rotavirus utilizan a JAM-A para un fin similar, ya que recientemente se describió que los rotavirus son capaces de diseminarse fuera del intestino (Alfajaro, 2014).

Por otro lado, el hecho de que las diferentes cepas de rotavirus que se probaron requieran ocludina para su entrada, además de la co-localización que existe entre la ocludina y las partículas de rotavirus de la cepa RRV a tiempos tempranos de la infección, demuestran la importancia que tienen diferentes proteínas de UE para la entrada de estos virus. El hecho de que el virus parezca internalizarse junto con la ocludina en células MA104 puede explicarse de dos maneras:

1. El virus utiliza la proteína como co-receptor para su entrada.
2. Las partículas virales requieren de la internalización de ocludina para ingresar al citoplasma celular.

En el primer escenario, el virus sería capaz de interactuar con ocludina posiblemente en un paso posterior a su interacción con JAM-A, ya que no se observó la co-internalización de las partículas virales con la proteína JAM-A. En este escenario, las partículas virales necesitarían que JAM-A y ocludina se localicen en el espacio intercelular por acción de la proteína ZO-1. El silenciamiento de la expresión de ambas proteínas por separado no produce disminuciones en infectividad similares a las que produce la proteína ZO-1. Esto de nuevo apoya el hecho de que ambas proteínas actúen en conjunto (JAM-A y ocludina) durante la entrada de rotavirus a células MA104.

En el segundo escenario, las partículas virales podrían internalizarse junto con la ocludina sin necesidad de que exista una interacción física entre ellas. Los cosackievirus tipo B inducen la internalización de ocludina durante su proceso de entrada a su célula hospedera. Las partículas virales co-localizan con ocludina en el citoplasma celular, al parecer dentro de vesículas endocíticas. Sin embargo,

hasta la fecha no se ha demostrado que las partículas virales interactúen con ocludina directamente. Los coxsackievirus tipo B inducen la internalización de ocludina por medio de macropinocitosis, lo cual difiere de manera sustancial del mecanismo de endocitosis mediada por clatrina descrito para la internalización de ocludina en varios tipos celulares (Coyne, 2007; Ivanov, 2004).

La internalización de las partículas de coxsackievirus depende de dinamina, una proteína previamente relacionada con procesos de endocitosis, sin embargo, al bloquear la macropinocitosis mediante tratamientos farmacológicos, la entrada de coxsackievirus B se ve severamente afectada. Por lo que parece ser indispensable que el virus induzca la internalización de ocludina mediante macropinocitosis para poder ingresar al citoplasma celular.

El fenómeno anterior podría ser útil para explicar por qué distintas cepas de rotavirus entran por distintas vías endocíticas pese a que todas requieren ocludina y JAM-A (con excepción de YM) para su entrada a células MA104. Cada cepa podría tener un patrón de interacción con sus co-receptores distinto, y este patrón podría ser el que marca la vía de entrada. Al haber más de una molécula celular implicada en la entrada, las interacciones entre las partículas virales y sus receptores y co-receptores podrían ser una especie de huella digital que defina la vía endocítica de entrada para estos virus.

Es importante estudiar a mayor profundidad el papel que juegan tanto la ocludina como ZO-1 en la entrada de rotavirus. En estudios anteriores se ha reportado que la infección por rotavirus altera la localización de ocludina en células Caco-2 mediante un mecanismo dependiente de proteína cinasa A (PKA), sin embargo, estos cambios en distribución no se asociaron a disminuciones en la replicación viral (Dickman, 2000), lo cual podría sugerir que estas alteraciones de localización



en la ocludina afectan pasos previos a la replicación y tienen un efecto importante en la entrada del virus.

A la fecha se conocen diferentes virus que son capaces de utilizar proteínas de uniones estrechas como receptores o co-receptores, entre estos virus se encuentran el virus de la hepatitis C, que utiliza ocludina y claudina-1 (Meertens, 2008), el coxsackievirus B, que requiere de CAR y ocludina (Coyne, 2007) y por supuesto reovirus que utiliza a JAM-A (Barton, 2001). Curiosamente todos los virus antes mencionados son capaces de infectar epitelios polarizados, al igual que los rotavirus, lo cual sugiere que las proteínas de UE son importantes para aquellos virus que infectan este tipo de epitelios.

Los resultados de este trabajo, junto con los reportes anteriores en los que se proponen diferentes glicanos como receptores para rotavirus (Hu, 2012, Isa, 2006, Martínez, 2013), y diferentes integrinas ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$ ) y la proteína de choque término hsc70 como correceptores (López y Arias, 2006) únicamente demuestran la complejidad del proceso de entrada de los rotavirus a su célula hospedera. A medida que se describen más proteínas asociadas a la entrada de rotavirus uno se pregunta si la lista está completa y si todas estas proteínas son capaces de actuar en conjunto o si únicamente abren la posibilidad de que el virus utilice diferentes vías de entrada, algunas de las cuales (como las uniones estrechas) podrían ser más importantes cuando el virus infecta a su hospedero natural, ya que se localizan en la porción apical de la membrana basolateral de los enterocitos, con lo cual están disponibles para que el virus las utilice como receptores y correceptores.

## 8. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. Las proteínas de uniones estrechas JAM-A, ocludina y ZO-1 muestran una distribución intercelular en forma de “panal” en monocapas de células MA104, similar a la que muestran en cultivos de células polarizadas y epitelios.
2. Las claudinas -14 y -16 muestran una distribución citoplásmica.
3. Las claudinas -9, -14 y -16 son importantes en etapas posteriores a la entrada de rotavirus a células MA104.
4. La proteína JAM-A actúa como co-receptor para rotavirus en células MA104, excepto para la cepa YM
5. La proteína viral VP4 define el uso de JAM-A como co-receptor.
6. La proteína ocludina es importante para la entrada de rotavirus a células MA104 y co-localiza con VP7 durante los primeros 60 minutos de la infección.
7. La proteína ZO-1 es importante para la entrada de rotavirus y mantiene a JAM-A y ocludina en su localización intercelular.

## 9. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las proteínas de uniones estrechas (JAM-A, Ocludina y ZO-1) están involucradas en la entrada de rotavirus a células MA104. Estudiar las interacciones específicas entre estas proteínas y las partículas virales, así como caracterizar los mecanismos intracelulares que se activan por las interacciones entre los rotavirus y las proteínas de uniones estrechas redondearía la información obtenida en este trabajo, lo que un futuro permitiría el diseño de estrategias antivirales dirigidas para bloquear la infección por rotavirus.

## 10. Referencias

- Alfajaro, M. M., & Cho, K. O. (2014). Evidences and consequences of extra-intestinal spread of rotaviruses in humans and animals. *VirusDisease*, 25(2), 186-194.
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269(4), G467-G475.
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2), a002584.
- Andreeva, A. Y., Krause, E., Müller, E. C., Blasig, I. E., & Utepbergenov, D. I. (2001). Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38480-38486.
- Antar, A. A., Konopka, J. L., Campbell, J. A., Henry, R. A., Perdigoto, A. L., Carter, B. D., ... & Dermody, T. S. (2009). Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host & Microbe*, 5(1), 59-71.
- Arias, C. F., Silva-Ayala, D., & López, S. (2015). Rotavirus Entry: a Deep Journey into the Cell with Several Exits. *Journal of Virology*, 89(2), 890-893.
- Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(8), 442-448.

Assimakopoulos, S. F., Papageorgiou, I., & Charonis, A. (2011). Enterocytes' tight junctions: from molecules to diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2(6), 123.

Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J., & Dermody, T. S. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*, 104(3), 441-451.

Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), 525-530.

Bazzoni, G., Martínez-Estrada, O. M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., & Dejana, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20520-20526.

Chan, M. C., Chan, R. W., Yu, W. C., Ho, C. C., Chui, W. H., Lo, C. K., ... & Peiris, J. S. (2009). Influenza H5N1 virus infection of polarized human alveolar epithelial cells and lung microvascular endothelial cells. *Respir Res*, 10(102), 10-1186.

Ciarlet, M., Crawford, S. E., & Estes, M. K. (2001). Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *Journal of Virology*, 75(23), 11834-11850.

Coyne, C. B., & Bergelson, J. M. (2005). CAR: a virus receptor within the tight junction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(6), 869-882.

Coyne, C. B., & Bergelson, J. M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, 124(1), 119-131.

Coyne, C. B., Shen, L., Turner, J. R., & Bergelson, J. M. (2007). Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host & Microbe*, 2(3), 181-192.

Cuadras, M. A., & Greenberg, H. B. (2003). Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface in vitro and in vivo. *Virology*, 313(1), 308-321.

Cuadras, M. A., Arias, C. F., & Lopez, S. (1997). Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration to initiate their replication cycle. *Journal of Virology*, 71(12), 9065-9074.

Cummins, P. M. (2012). Occludin: one protein, many forms. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 242-250.

Davison, E., Diaz, R. M., Hart, I. R., Santis, G., & Marshall, J. F. (1997). Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *Journal of Virology*, 71(8), 6204-6207.

De Vries, E., Tscherne, D. M., Wienholts, M. J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., & De Haan, C. A. (2011). Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog*, 7(3).

Delmas, O., Breton, M., Sapin, C., Le Bivic, A., Colard, O., & Trugnan, G. (2007). Heterogeneity of raft-type membrane microdomains associated with VP4, the rotavirus spike protein, in Caco-2 and MA 104 cells. *Journal of Virology*, 81(4), 1610-1618.

Díaz-Salinas, M. A., Romero, P., Espinosa, R., Hoshino, Y., López, S., & Arias, C. F. (2013). The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *Journal of Virology*, 87(3), 1658-1663.

Dickman, K. G., Hempson, S. J., Anderson, J., Lippe, S., Zhao, L., Burakoff, R., & Shaw, R. D. (2000). Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(4), G757-G766.

Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y. J., Blixt, O., Paulson, J. C., Wagner, G., & Harrison, S. C. (2002). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8\* core. *Journal of Virology*, 76(20), 10512-10517.

Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y. J., Wagner, G., & Harrison, S. C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *The EMBO Journal*, 21(5), 885-897.

Dunn, E. F., & Connor, J. H. (2012). HijAkt: The PI3K/Akt pathway in virus replication and pathogenesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 106, 223.

Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., zu Brickwedde, M. K. M., Ohno, S., & Vestweber, D. (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *The EMBO Journal*, 20(14), 3738-3748.

Estes M.K. y Greenberg B. (2013) Rotaviruses .In: Fields, B., Knipe, D., & Howley, P. *Fields Virology*. Sixth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, *446*(7137), 801-805.

Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., & Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(45), 29745-29753.

Fredriksson, K., Van Itallie, C. M., Aponte, A., Gucek, M., Tietgens, A. J., & Anderson, J. M. (2015). Proteomic Analysis of Proteins Surrounding Occludin and Claudin-4 Reveals Their Proximity to Signaling and Trafficking Networks. *PLoS One*, *10*(3).

González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Ávila-Flores, A. (2000, August). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 11, No. 4, pp. 315-324). Academic Press.

González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1778*(3), 729-756.

Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., & Coulson, B. S. (2003). Integrin-using rotaviruses bind  $\alpha 2\beta 1$  integrin  $\alpha 2$  I domain via VP4 DGE sequence and recognize  $\alpha X\beta 2$  and  $\alpha V\beta 3$  by using VP7 during cell entry. *Journal of Virology*, *77*(18), 9969-9978.

Guerrero, C. A., Bouyssouade, D., Zárata, S., Iša, P., López, T., Espinosa, R., & Arias, C. F. (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of Virology*, *76*(8), 4096-4102.



Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., & Citi, S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(3), 601-613.

Haselhorst, T., Fleming, F. E., Dyason, J. C., Hartnell, R. D., Yu, X., Holloway, G., ... & von Itzstein, M. (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature Chemical Biology*, 5(2), 91-93.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J., & Stevenson, B. R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(1), 199-208.

Hewish, M. J., Takada, Y., & Coulson, B. S. (2000). Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 1$  can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *Journal of Virology*, 74(1), 228-236.

Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-Penfield, N. W., Smith, D. F., Le Pendu, J., & Prasad, B. V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*, 485(7397), 256-259.

Hung, T. J., & Kemphues, K. J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*, 126(1), 127-135.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 171(6), 939-945.

Isa, P., Arias, C. F., & López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate Journal*, 23(1-2), 27-37.

Iša, P., Realpe, M., Romero, P., López, S., & Arias, C. F. (2004). Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, 322(2), 370-381.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1351-1363.

Itoh, M., Morita, K., & Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and  $\alpha$  catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5981-5986.

Ivanov, A. I., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Molecular Biology of the Cell*, 15(1), 176-188.

Kostrewa, D., Brockhaus, M., D'Arcy, A., Dale, G. E., Nelboeck, P., Schmid, G., ... & Hennig, M. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *The EMBO Journal*, 20(16), 4391-4398.

Lacaz-Vieira, F., Jaeger, M. M. M., Farshori, P., & Kachar, B. (1999). Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. *The Journal of membrane biology*, 168(3), 289-297.

Lal-Nag, M., & Morin, P. J. (2009). The claudins. *Genome Biol*, 10(8), 235.

Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., ... & Parkos, C. A. (2007). JAM-A regulates permeability and

inflammation in the intestine in vivo. *The Journal of Experimental medicine*, 204(13), 3067-3076.

Li, E., Brown, S. L., Stupack, D. G., Puente, X. S., Cheresh, D. A., & Nemerow, G. R. (2001). Integrin  $\alpha\beta 1$  is an adenovirus coreceptor. *Journal of Virology*, 75(11), 5405-5409.

Li, W. Y., Huey, C. L., & Alan, S. L. (2004). Expression of claudin-7 and-8 along the mouse nephron. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(6), F1063-F1071.

López, S., & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in Microbiology*, 12(6), 271-278.

Lopez, S., & Arias, C. F. (2006). Early steps in rotavirus cell entry. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (pp. 39-66). Springer Berlin Heidelberg.

Lu, Z., Ding, L., Hong, H., Hoggard, J., Lu, Q., & Chen, Y. H. (2011). Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 317(13), 1935-1946.

Ludwig, R. J., Zollner, T. M., Santoso, S., Hardt, K., Gille, J., Baatz, H., ... & Podda, M. (2005). Junctional adhesion molecules (JAM)-B and-C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(5), 969-976.

Madara, J. L. (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 143-159.

Martínez, M. A., López, S., Arias, C. F., & Isa, P. (2013). Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *Journal of Virology*, 87(2), 1115-1122.

Mattagajasingh, S. N., Huang, S. C., Hartenstein, J. S., & Benz, E. J. (2000). Characterization of the interaction between protein 4.1 R and ZO-2 A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30573-30585.

Matter, K., & Balda, M. S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), 225-237.

Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., & Balda, M. S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5), 453-458.

McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., ... & Schneeberger, E. E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *Journal of Cell Science*, 109(9), 2287-2298.

Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F. L., & Dragic, T. (2008). The tight junction proteins claudin-1,-6, and-9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 82(7), 3555-3560.

Milstone, A. M., Petrella, J., Sanchez, M. D., Mahmud, M., Whitbeck, J. C., & Bergelson, J. M. (2005). Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *Journal of Virology*, 79(1), 655-660.

Monteiro, A. C., Sumagin, R., Rankin, C. R., Leoni, G., Mina, M. J., Reiter, D. M., ... & Parkos, C. A. (2013). JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Molecular biology of the cell*, 24(18), 2849-2860.

Muller, W. A. (2003). Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology*, 24(6), 326-333.

Nava, P., Capaldo, C. T., Koch, S., Kolegraff, K., Rankin, C. R., Farkas, A. E., ... & Nusrat, A. (2011). JAM-A regulates epithelial proliferation through Akt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO reports*, 12(4), 314-320.

Nava, P., López, S., Arias, C. F., Islas, S., & González-Mariscal, L. (2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 117(23), 5509-5519.

Nusrat, A., Parkos, C. A., Verkade, P., Foley, C. S., Liang, T. W., Innis-Whitehouse, W., ... & Madara, J. L. (2000). Tight junctions are membrane microdomains. *Journal of Cell Science*, 113(10), 1771-1781.

Ozaki, H., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., Kawamoto, T., Okawa, K., ... & Kita, T. (1999). Cutting edge: combined treatment of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 163(2), 553-557.

Pando, V., Iša, P., Arias, C. F., & López, S. (2002). Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology*, 295(1), 190-200.

Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., ... & Blasig, I. E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal*, 22(1), 146-158.

Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., ... & Turner, J. R. (2010). Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Molecular Biology of the Cell*, 21(7), 1200-1213.

Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 78(19), 10213-10220.

Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 78(19), 10213-10220.

Salone, B., Martina, Y., Piersanti, S., Cundari, E., Cherubini, G., Franqueville, L., ... & Saggio, I. (2003). Integrin  $\alpha 3\beta 1$  Is an Alternative Cellular Receptor for Adenovirus Serotype 5. *Journal of Virology*, 77(24), 13448-13454.

Sánchez-Pulido, L., Martín-Belmonte, F., Valencia, A., & Alonso, M. A. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(12), 599-601.

Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(6), C1213-C1228.

Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO Journal*, 30(2), 408-416.

Shieh, J. T., & Bergelson, J. M. (2002). Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, 76(18), 9474-9480.

Shin, K., Fogg, V. C., & Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 207-235.

Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S., & Arias, C. F. (2013). Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), 10270-10275.

Sobo, K., Rubbia-Brandt, L., Brown, T. D. K., Stuart, A. D., & McKee, T. A. (2011). Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, *85*(23), 12376-12386.

Steed, E., Balda, M. S., & Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. *Trends in Cell Biology*, *20*(3), 142-149.

Steed, E., Rodrigues, N. T., Balda, M. S., & Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biology*, *10*(1), 95.

Svensson, L., Finlay, B. B., Bass, D., Von Bonsdorff, C. H., & Greenberg, H. B. (1991). Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Journal of Virology*, *65*(8), 4190-4197.

Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(4), 285-293.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., ... & Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, *126*(4), 741-754.

Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.*, *68*, 403-429.

von Hahn, T., & Rice, C. M. (2008). Hepatitis C virus entry. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(7), 3689-3693.

Who.int,. (2015). *WHO | Rotavirus*. Retrieved 2 November 2015, from <http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/>

Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, *73*(2), 309-319.

Wong, V., & Gumbiner, B. M. (1997). A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *The Journal of Cell Biology*, *136*(2), 399-409.

Yu, X., Coulson, B. S., Fleming, F. E., Dyason, J. C., von Itzstein, M., & Blanchard, H. (2011). Novel structural insights into rotavirus recognition of ganglioside glycan receptors. *Journal of Molecular Biology*, *413*(5), 929-939.

Zárate, S., Cuadras, M. A., Espinosa, R., Romero, P., Juárez, K. O., Camacho-Nuez, M., ... & López, S. (2003). Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of Virology*, *77*(13), 7254-7260.

Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C. A., Arias, C. F., & López, S. (2000). Integrin  $\alpha 2 \beta 1$  mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology*, *278*(1), 50-54.

Zárate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C. F., & López, S. (2004). VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin  $\alpha v \beta 3$  through a novel integrin-binding site. *Journal of Virology*, *78*(20), 10839-10847.

Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P. R., Bellamy, R., Harrison, S. C., & Grigorieff, N. (2008). Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(6), 1867-1872.



Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., ... & Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 81(22), 12465-12471.

## **10. Anexo 1**

El trabajo contenido en esta tesis se encuentra consignado como artículo original de investigación. La versión original de este artículo, en inglés, se incluye a continuación:



# The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells



Jesús M. Torres-Flores, Daniela Silva-Ayala, Marco A. Espinoza, Susana López, Carlos F. Arias\*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 August 2014

Returned to author for revisions

12 September 2014

Accepted 12 November 2014

Available online 5 December 2014

### Keywords:

Rotavirus

Virus entry

Tight junction proteins

JAM-A

Occludin

ZO-1

## ABSTRACT

Several molecules have been identified as receptors or coreceptors for rotavirus infection, including glycans, integrins, and hsc70. In this work we report that the tight junction proteins JAM-A, occludin, and ZO-1 play an important role during rotavirus entry into MA104 cells. JAM-A was found to function as coreceptor for rotavirus strains RRV, Wa, and UK, but not for rotavirus YM. Reassortant viruses derived from rotaviruses RRV and YM showed that the virus spike protein VP4 determines the use of JAM-A as coreceptor.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Rotavirus is an important etiologic agent of gastroenteritis in children under 3 years of age (Tate et al., 2012). *In vivo*, this virus infects primarily mature enterocytes in the intestinal polarized epithelium, however, most studies on rotavirus biology have been carried out in nonpolarized cultures of MA104 (epithelial monkey kidney cells), since these are the cells most permissive for replication of the virus in cultured cells. Attachment and entry into the target cell are the first steps of viral infection, and several cell surface molecules have been involved as receptors or coreceptors for rotavirus, including sialic acid, integrins, and hsc70 (Lopez and Arias, 2006), and more recently histo-blood group antigens were also reported to mediate the attachment of some rotavirus strains (Hu et al., 2012; Huang et al., 2012). In a recent siRNA screening we obtained evidence that suggested that the tight junction (TJ) proteins JAM-A, occludin, and ZO-1 might also play an important role during rotavirus RRV entry into MA104 cells (Silva-Ayala et al., 2013).

JAM-A is an integral TJ protein that possesses two extracellular V-type Ig domains, one transmembrane domain and a short

carboxy-terminal intracellular domain. JAM-A has been implicated in the entry of reovirus (Barton et al., 2001) and feline calicivirus (Makino et al., 2006). Occludin is a tetraspan membrane protein with two extracellular loops, which are kept apart by a short intracellular loop. Both, the carboxy- and amino-terminal domains are cytoplasmic and are involved in several signaling pathways (Cummins, 2012). Occludin has been involved in the entry of hepatitis C virus and Coxsackie virus B (Coyne et al., 2007; Ploss et al., 2009). ZO-1 is a TJ plaque protein that serves as a bridge between the integral TJ proteins and the actin cytoskeleton, and acts as an adapter for the intracellular proteins involved in signaling processes (Chi et al., 2012; Rodgers et al., 2013). So far, ZO-1 has not been involved in the entry or replication of any virus.

This study addresses the role of JAM-A, occludin, and ZO-1 in the entry process of various rotavirus strains and identifies the viral protein that participates in the interaction of the virus with JAM-A.

## Results

### *Tight junction proteins localize to intercellular contacts in confluent MA104 cell monolayers*

Functional TJs are found at the cell–cell contacts in polarized epithelia or in polarized cell cultures. However, since in this work we used non-polarized cells, we first studied the cellular distribution of JAM-A, occludin, and ZO-1 in confluent MA104 monolayers.

\* Corresponding author. Fax: +52 777 3172388.

E-mail addresses: [jmtorres@ibt.unam.mx](mailto:jmtorres@ibt.unam.mx) (J.M. Torres-Flores), [dsilva@ibt.unam.mx](mailto:dsilva@ibt.unam.mx) (D. Silva-Ayala), [maet@ibt.unam.mx](mailto:maet@ibt.unam.mx) (M.A. Espinoza), [susana@ibt.unam.mx](mailto:susana@ibt.unam.mx) (S. López), [arias@ibt.unam.mx](mailto:arias@ibt.unam.mx) (C.F. Arias).

JAM-A was detected in nonpermeabilized cells, with most of the signal showing a typical honeycomb pattern (Fig. 1A), similar to that observed in polarized cells (Iden et al., 2012). Occludin and ZO-1 were also readily detected at the intercellular junctions when the cells were permeabilized, although a large proportion of ZO-1 appeared dispersed in the cytoplasm (Fig. 1B and C).

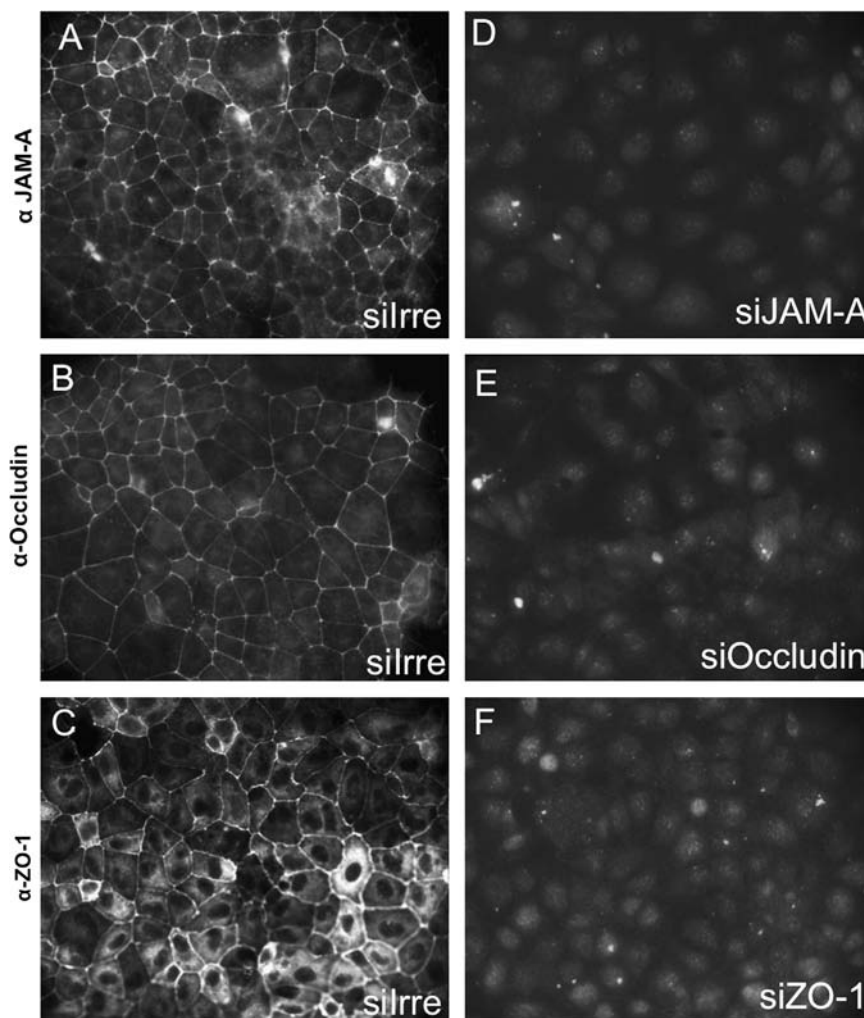
#### Different rotavirus strains use tight junction proteins during their entry into MA104 cells

To characterize the role of JAM-A, occludin, and ZO-1 on the infectivity of rotavirus strains Wa (human), UK (bovine), YM (porcine), and RRV (simian), we silenced their expression by RNAi. When the expression of JAM-A was silenced, the infectivity of rotavirus strains UK, RRV, and Wa was reduced by about 50%, but the infectivity of rotavirus YM was not affected (Fig. 2A). Knocking down the expression of JAM-A did not affect the infectivity of these viruses when the replication cycle started from transfected DLPs (Fig. 2A), bypassing the entry step (Silva-Ayala et al., 2013), suggesting that all strains, but YM, use JAM-A to enter MA104 cells.

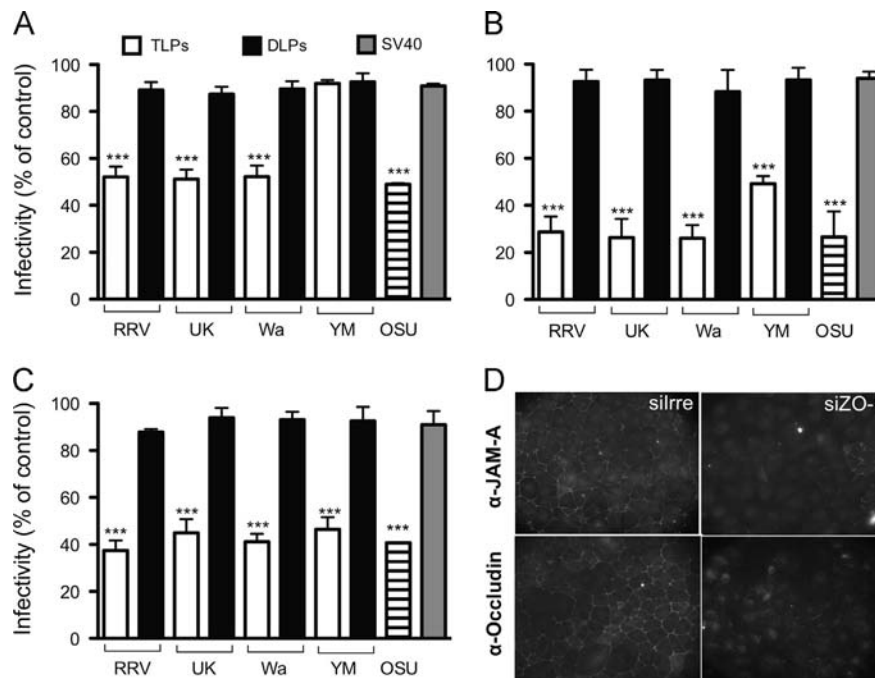
The knockdown of occludin reduced in 50–60% the infectivity of all four rotaviruses, and this effect was also exerted at the virus entry level, as shown by the lack of inhibition when DLPs were transfected

(Fig. 2B). Silencing the expression of ZO-1 also reduced the infectivity of all strains in 50–70% (Fig. 2C). Since ZO-1 plays an important role in the formation and maintenance of TJs in polarized cells (Fanning et al., 1998; Ikenouchi et al., 2007; Umeda et al., 2006), we determined the cellular localization of JAM-A, and occludin, in ZO-1-silenced cells. The subcellular localization of both proteins was altered under these conditions. JAM-A mostly disappeared from the cell–cell junctions and its overall abundance decreased significantly, suggesting a possible degradation of the protein, while the distribution of occludin shifted, from a mostly junctional localization to a punctuated cytoplasmic signal (Fig. 2D). These observations strongly suggest that the localization of both JAM-A and occludin in nonpolarized MA104 cells is maintained by ZO-1 and that this localization is necessary for virus entry. This complicates the evaluation of the effect that silencing ZO-1 might have *per se* on the infectivity of the virus. The effect of the various siRNAs used was specific for rotaviruses, since the replication of SV40, whose infectivity has not been reported to require TJ proteins, was not affected by the siRNA treatments (Fig. 2A–C).

Since YM behaves differently from the other rotavirus strains tested, we evaluated if its phenotype was associated with its porcine origin. For this, we characterized the effect of silencing the TJ proteins on the infectivity of the porcine rotavirus strain



**Fig. 1.** Tight junction proteins localize to intercellular contacts in MA104 cells. MA104 cells on glass coverslips were transfected with the indicated siRNAs using a reverse method (Silva-Ayala et al., 2013), and 72 hpt cells were fixed and permeabilized (anti-occludin and anti-ZO-1) or not (anti-JAM-A) and stained for indirect immunofluorescence as indicated under *Materials and methods* using a monoclonal antibody (MAb J10.4) to the distal membrane extracellular domain of JAM-A, or polyclonal antibodies to ZO-1, or to the intracellular N-terminal cytoplasmic tail of occludin, as indicated, followed by incubation with secondary Alexa-conjugated antibodies. silrre stands for an irrelevant siRNA, which in this immunofluorescence assays was an siRNA against luciferase.



**Fig. 2.** Different rotavirus strains use TJ proteins during their entry into MA104 cells. MA104 cells were transfected with siRNAs against (A) JAM-A, (B) ZO-1 or (C) Occludin, using a reverse method. After 72 hpt, cells were infected with rotavirus strains RRV, UK, Wa, and YM (open bars) or OSU (hatched bar) at a MOI of 0.02, or with SV40 (gray bars). Cells lipofected with purified DLPs of the indicated strains at a concentration that would infect cells at an MOI equivalent to 0.02 are also shown (closed bars). At 14 hpi the cells were fixed and immunostained for a peroxidase assay as described in *Materials and methods*. Data were normalized against the infectivity of each virus in cells treated with an siRNA against luciferase. (D) MA104 cells were transfected with an siRNA against ZO-1 and 72 hpt the cells were fixed and prepared for an immunofluorescence assay as described in *Materials and methods*, using MAb J10.4, directed to JAM-A, or a polyclonal antibody to occludin. Secondary antibodies coupled with Alexa were used for signal detection. The arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments is shown. \*\*\*,  $P < 0.001$ .

OSU, which shares the P[7] genotype with rotavirus YM. As can be seen in Fig. 2A–C, the infectivity of this strain was affected by silencing the expression of all three TJ proteins, suggesting that they are important for rotavirus entry independently of the host of origin and the P genotype, and that the behavior of the porcine strain YM may be exceptional.

#### JAM-A functions as coreceptor for rotavirus strains RRV, UK, and Wa

We tested if the monoclonal antibody (MAb) J10.4, directed against the distal extracellular domain of JAM-A, was capable of blocking rotavirus infection. The antibody reduced the infectivity of rotavirus strains RRV, Wa, and UK by about 50%, while it blocked that of reovirus T3D by 80% (Fig. 3A). This level of inhibition was similar to that observed for reovirus in Caco-2 cells when the same antibody was used (Barton et al., 2001). Consistent with our previous observations, MAb J10.4 did not affect the infectivity of rotavirus YM or SV40.

To determine whether the JAM-A antibody reduced virus infectivity by blocking the binding of the virus to the cell surface or at a post-binding step, we added the MAb after the virus had been adsorbed to the cells. Again, MAb J10.4 reduced the infectivity of rotavirus RRV, UK, and Wa by approximately 50% when added after the adsorption period (Fig. 3B), a result that strongly suggests that JAM-A is required by these viruses at a post-attachment step. In contrast, the infectivity of reovirus T3D was not affected under these conditions, consistent with previous reports that indicate that reovirus uses JAM-A for cell attachment (Kirchner et al., 2008; Zhang et al., 2010).

The requirement of JAM-A for virus entry was confirmed by testing the ability of soluble purified JAM-A to block rotavirus infection when preincubated with the virus before infection. The purified protein blocked the infectivity of rotavirus strains RRV, UK, and Wa, but not YM, by about 60% (Fig. 3C).

To further demonstrate that JAM-A is required at a post-attachment step, we tested the effect of either preincubating the

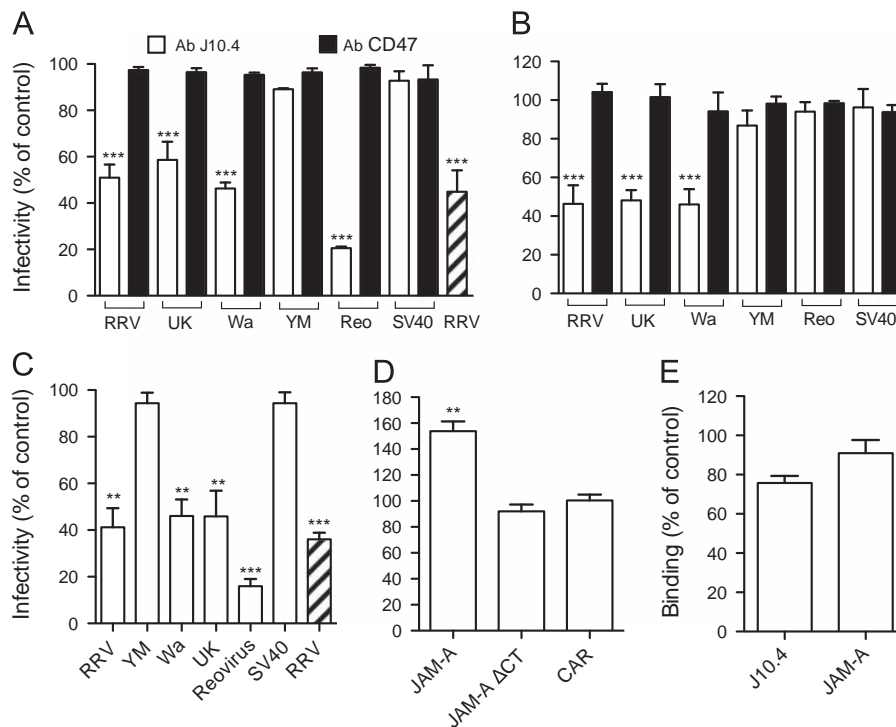
cells with the anti-JAM-A antibody J10.4 or preincubating RRV with soluble JAM-A, on the binding of this rotavirus strain to MA104 cells. Neither of these treatments blocked the attachment of the virus to the cell surface (Fig. 3E). Altogether, these results indicate that JAM-A is able to interact directly with the virus particle and it is used by rotavirus at a post-binding step.

To test the relevance of JAM-A for rotavirus infection of human intestinal epithelial cells, we evaluated the ability of the anti-JAM-A antibody and the soluble form of the protein to block RRV infection of Caco-2 cells (Fig. 3A and B, hatched bars). Both, MAb J10.4 and the soluble form of JAM-A, at a concentration of 1  $\mu$ g/ml, reduced the infectivity of the virus by about 60%. This result suggests that JAM-A is a conserved requirement for rotavirus infection of intestinal cells.

Furthermore, we tested if the overexpression of JAM-A in mouse fibroblasts, which are 100-fold less susceptible than MA104 cells to rotavirus infection (Bass et al., 1992) would increase their susceptibility for virus replication. Fig. 3D shows that overexpression of a full length JAM-A protein increased the infectivity of RRV by about 50%, while a JAM-A molecule with a truncated carboxy-terminal did not facilitate rotavirus infection. These observations suggest that the presence of JAM-A renders L cells more susceptible for rotavirus RRV infection and that the cytoplasmic tail of the protein may play a role in virus entry, probably by triggering a signaling cascade. On the other hand, overexpression of the CAR receptor, a protein related to JAM-A (Bergelson et al., 1997; Luissint et al., 2014), did not support the increase in infectivity of rotavirus RRV, showing the specific use of JAM-A by the virus.

#### The spike protein VP4 defines the requirement of rotavirus strain RRV for JAM-A during cell entry

We have reported that VP4 defines the endocytic pathway and the intracellular vesicular traffic used by rotaviruses in MA104 cells (Diaz-Salinas et al., 2013, 2014). Here, to determine which viral



**Fig. 3.** JAM-A is a coreceptor for rotavirus. MA104 cells were incubated with either an antibody against JAM-A (MAb J10.4) or a control IgG isotype (CD47) for 1 h at 4 °C before (A) or after (B) attachment of the indicated virus for 1 h at 4 °C as indicated in *Materials and methods*. Cells were shifted to 37 °C and the infection was allowed to proceed for 14 h. Virus infectivity was measured using an immunoperoxidase focus forming unit (FFU) assay. Data were normalized against the infectivity of each virus in mock treated cells. The hatched bar shows the infectivity of RRV in Caco-2 cells. (C) Purified JAM-A protein at a concentration of 1 μg/ml was incubated for 1 h at 4 °C with the indicated virus; JAM-A pre-treated virus was then incubated with MA104 cells and 14 hpi cells were fixed and immunostained as described in *Material and methods*. Data were normalized against the infectivity of each virus in mock-treated cells. The hatched bar shows the infectivity of RRV in Caco-2 cells. (D) L929 mouse fibroblasts were transfected with plasmids encoding a wild-type or a mutant version ( $\Delta$ CT) of JAM-A, or wild-type CAR and, at 48 hpt, infected with 2000 FFUs per well of rotavirus strain RRV. Virus infectivity in cells expressing the indicated proteins was obtained normalizing against the infectivity observed in nontransfected cells. The arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments is shown. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (E) MA104 cells were incubated with MAb J10.4 for 1 h at 4 °C, and then further incubated with 500 ng of CsCl-purified RRV TLPs for 1 h at 4 °C (J10.4), or with 500 ng of purified RRV TLPs that were previously treated with 1 μg/ml of soluble JAM-A (JAM-A). After this time the unbound virus was washed away with cold PBS and the bound virus was determined by ELISA as described in *Material and methods*.

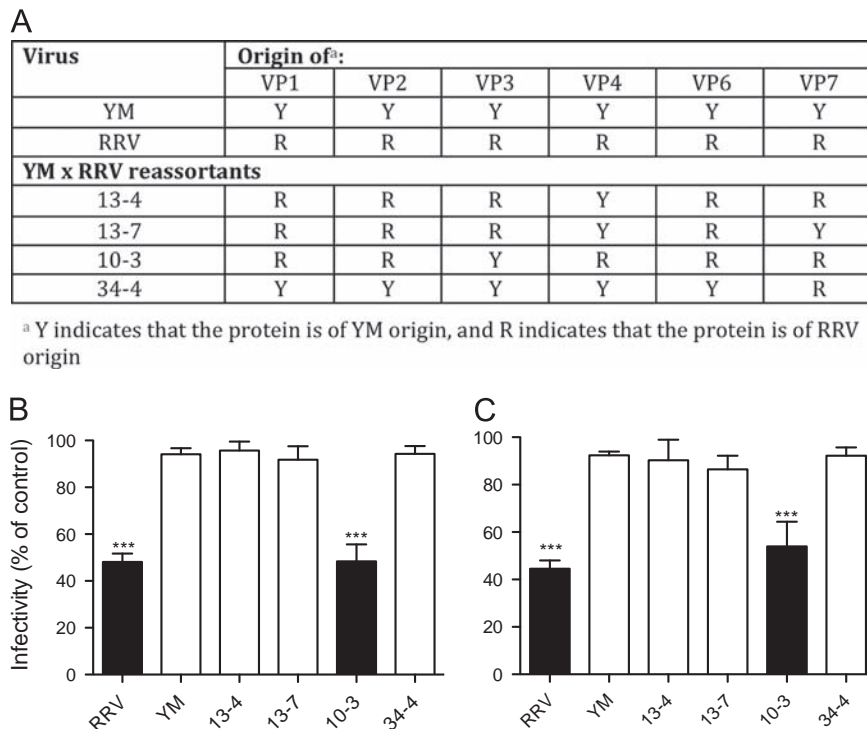
protein was responsible for the interaction with JAM-A, we took advantage of the differential dependence of RRV and YM on JAM-A, and the availability of a panel of RRV  $\times$  YM reassortant viruses (Espinoza et al., unpublished results, Fig. 4A). The infectivity of the parental strains and the reassortant viruses was tested on cells treated with an siRNA directed to JAM-A. We found that the reassortants having the VP4 of YM showed the same phenotype as the parental YM strain (Fig. 4B). These included reassortants that had either the VP4 and VP7 proteins of YM (13-7) or only the VP4 protein of YM (13-4) in a background of RRV structural proteins. On the other hand, the infectivity of reassortant 34-4, which has the VP7 gene of RRV in the genetic background of YM was not affected. A reassortant having the VP4 protein of RRV in a YM background was not available, nevertheless, an RRV reassortant having only the VP3 protein of YM (10-3) behaved as the parental RRV. These results suggest that VP4, but not VP7, defines the requirement of JAM-A for rotavirus infection. Similar results were obtained when MAb J10.4 was used to block the infection of the RRV  $\times$  YM reassortants (Fig. 4C).

## Discussion

Diverse viruses use proteins of the apical junctional complex (tight and adherence junctions) as receptors or coreceptors for cell infection (Barton et al., 2001; Benedicto et al., 2012; Gonzalez-Mariscal et al., 2009). In this work we identified JAM-A as a coreceptor for the entry of some rotavirus strains into nonpolarized MA104 cells, and also showed that occludin and ZO-1 are required during the entry process. We have previously reported that RRV

internalizes into cells by clathrin-independent endocytosis, while rotaviruses YM, Wa, and UK enter cells by a clathrin-dependent endocytic pathway (Diaz-Salinas et al., 2013; Gutierrez et al., 2010). These observations suggest that the use of JAM-A does not define the endocytic pathway followed by the virus but that it is more likely involved in an entry step yet to be defined. It has been shown for reovirus that JAM-A is dispensable for replication in intestinal and neural cells in mice, but it is required for systemic dissemination in the organism (Boehme et al., 2013). It remains to be investigated whether rotavirus uses JAM-A for a similar purpose in those cases where the extraintestinal spread of the virus has been observed (Blutt and Conner, 2007), and whether the TJ function itself is important for rotavirus cell entry in polarized epithelia. The role of occludin and ZO-1 on rotavirus entry needs to be further characterized, but these proteins may serve as scaffold to recruit and anchor signaling or regulatory molecules in the vicinity of virus entry, as suggested for occludin in the case of Coxsackie B virus (Coyne et al., 2007). Of interest, infection with rotavirus RRV was previously reported to alter the distribution of occludin in polarized Caco-2 cells by a protein A-dependent mechanism, although this change in distribution was not associated with an impaired virus replication (Beau et al., 2007).

Even though several molecules have been described as rotavirus receptors (Lopez and Arias, 2006), this is the first time that a set of proteins that belong to a structural feature of polarized epithelia has been associated with rotavirus entry. These findings, together with the previous involvement of glycans as virus receptors (Hu et al., 2012; Isa et al., 2006; Martinez et al., 2013), and integrins ( $\alpha$ 2b1 and  $\alpha$ vb3) and hsc70 as coreceptors (Lopez and Arias, 2006), provide



**Fig. 4.** The VP4 protein defines the use of JAM-A as coreceptor. (A) Origin of the capsid proteins of the YMxRRV reassortants used in this study. (B) MA104 cells were transfected with an siRNA against JAM-A and infected with the indicated virus (2000 FFUs). At 14 hpi the cells were fixed and immunostained for a peroxidase assay. Data were normalized against the infectivity of each virus in cells treated with an irrelevant siRNA. (C) MA104 cells were incubated with MAb J10.4, directed to JAM-A, for 1 h at 4 °C after the indicated virus had been attached to cells for 1 h at 4 °C, as indicated in *Materials and methods*. At 14 hpi the cells were fixed and immunostained for a peroxidase assay. Data were normalized against the infectivity of each virus in cells incubated with a control IgG isotype (CD47). Closed bars, RRV and reassortants bearing RRV VP4; open bars, YM and reassortants bearing YM VP4. The arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments is shown. \*\*\*,  $P < 0.001$ .

a complex panorama for the cell entry of this large nonenveloped virus. Despite the ample catalog of cellular molecules that have been involved in virus entry, one wonders if the list is complete and whether all described receptors/coreceptors function in concert as a very complex entry machinery or provide alternative routes of infection that might be relevant during replication of the virus in a natural host.

## Materials and methods

### Cells and viruses

The rhesus monkey epithelial cell line MA104 and the murine fibroblasts cell line L929 (ATCC) were grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 5% and 10% fetal bovine serum (FBS), respectively, at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Human intestinal epithelial cells (Caco-2, clone C2Bb1) were grown in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS and nonessential amino acids. Rhesus rotavirus RRV and bovine rotavirus UK were kindly donated by Y. Hoshino (NIAID-NIH, Bethesda, MD), and have been previously described (Diaz-Salinas et al., 2013; Feng et al., 2009). Rotavirus human strain Wa was obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford CA), and the porcine rotavirus OSU from L. Saif (Ohio State University, Wooster, OH). The porcine rotavirus strain YM was isolated in our laboratory (Ruiz et al., 1988). The YM x RRV rotavirus reassortants were generated in our laboratory. All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as previously described (Pando et al., 2002). Rotavirus cell lysates were activated with trypsin (10  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37 °C. Triple-layered particles (TLPs) and double-layered particles (DLPs) of RRV, UK, Wa, and YM strains were purified by

CsCl isopycnic gradients as described (Pando et al., 2002). The mammalian reovirus strain type 3 Dearing (ReoT3D) was a kind donation of T. S. Dermody (Vanderbilt University, Nashville TN). ReoT3D was propagated in L929 cells and the viral titer was determined in MA104 cells as previously described (Cuadras et al., 1997; Gutierrez et al., 2010). Simian virus 40 (SV40) was obtained from L. Gutiérrez (National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico). SV40-infected cells were detected by a fluorescence virus assay using an anti-SV40 TAG MAb as described previously (Stang et al., 1997).

### Antibodies, reagents, and plasmids

Monoclonal antibody (MAb) J10.4 against the extracellular membrane-distal domain of JAM-A was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). MAb CD47 was from Abcam, (Cambridge, UK). Polyclonal antibodies to ZO-1 and the intracellular C-terminal cytoplasmic tail of occludin were purchased from Life Technologies (Grand Island, NY). 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Alexa 488- and 568-conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes (Grand Island, NY). Rabbit hyperimmune sera to purified RRV rotavirus particles ( $\alpha$ -TLPs), and to purified reovirus particles ( $\alpha$ -Reo) were produced in our laboratory. Horse-radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from Perkin Elmer Life Sciences (Waltham, MA). Affinity purified JAM-A was obtained from Sino Biological Inc. (Beijing, China). Paraformaldehyde, bovine serum albumin (BSA), and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). The siRNAs were obtained from Dharmacon-Thermo Scientific (Pittsburgh, PA). pcDNA3.1 encoding human JAM-A, JAM-A  $\Delta$ CT, and human CAR were kindly provided by T. S. Dermody (Vanderbilt University, Tennessee).

### Immunofluorescence

MA104 cells were grown to confluence on glass coverslips and then fixed with 2% formaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. After this time, cells were washed three times with PBS containing 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, and then permeabilized or not by incubation with 0.5% Triton X-100 in blocking buffer [50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1% BSA in PBS] for 15 min, washed three times with PBS containing 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, and blocked by incubation overnight at 4 °C with 1% BSA and 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS. 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 Fluorekeep (Argene, Varilhes, France) and 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.

### Transfection of siRNAs

The indicated siRNAs were transfected into MA104 cell by a reverse method as described (Lopez et al., 2012). As control, an siRNA against luciferase was used. At 24 h post-transfection (hpt) the transfection mixture was removed and fresh Advanced DMEM-5% SFB was added; 72 hpt the cells were washed twice with MEM and subsequently infected with the indicated rotavirus strains. None of the assayed siRNAs was toxic for the cells, as determined by a lactate dehydrogenase (LDH) release assay, using a commercial kit (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO).

### Infectivity assay

Confluent MA104 cells in 96-well plates (for rotavirus and reovirus infection) or 24-well plates (for SV40 infection) were washed twice with MEM, and then approximately 2000 focus-forming units (FFU) of rotavirus or reovirus, or 6000 FFU of SV40 were adsorbed per well of cells during 60 min at 37 °C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, MEM was added, and the infection was left to proceed at 37 °C for 16 h for reovirus and rotavirus strains, or 18 h for SV40. Infected cells were detected by an immunoperoxidase focus-forming units assay using anti-TLPs for RRV, UK, OSU, and YM, a hyperimmune serum to rotavirus Wa, or  $\alpha$ -Reo for reovirus, as described previously (Gutierrez et al., 2010). Briefly, cell monolayers were fixed with 80% acetone in PBS, and intracellular viral antigen was detected with primary polyclonal antibodies followed by a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody as described. The FFUs were counted in a Visiolab 1000 station (Biocom, Les Ulises, France) as reported previously (Guerrero et al., 2000). SV40-infected cells were detected by a fluorescence focus assay using an anti-SV40 TAG MAb as described previously (Stang et al., 1997).

### Blocking assays

For the antibody blocking assays, MA104 cells were grown to confluence on 96-well plates and then incubated for 1 h at 4 °C with either 1  $\mu$ g/ml of anti JAM-A MAb J10.4 or 20  $\mu$ g/ml of an antibody against CD47 as an isotype control. Cells were then infected with 2000 FFUs per well of the corresponding rotavirus strains and the infected cells were detected using the immunoperoxidase assay described above. To determine if the antibody had an effect on binding of the virus or in a post-binding step, MA104 cells were grown to confluence in 96-well plates and then incubated for 1 h at 4 °C with 2000 FFUs per well of the corresponding rotavirus strains. After virus attachment, the unbound virus was removed by washing the cells twice with cold MEM and then either 1  $\mu$ g/ml of Mab J10.4 or 20  $\mu$ g/ml of antibody against CD47 were added for 1 h at 4 °C.

After this incubation period the cells were washed twice with cold MEM to remove the unbound antibody and then were shifted to 37 °C and the infection was allowed to proceed for 14 h. Rotavirus-infected cells were detected by the immunoperoxidase assay described above. To test the ability of purified JAM-A to block rotavirus infection the purified protein at a concentration of 1  $\mu$ g/ml was incubated for 1 h at 4 °C with 2000 FFUs of the corresponding rotavirus strains. MA104 cells were then incubated for 1 h with the JAM-A pre-treated virus. After this incubation period, the unbound virus was removed by washing the cells twice with cold MEM and the infection was allowed to proceed for 14 h and the infected cells were detected as described above.

### Binding assay

MA104 cells were incubated with 1  $\mu$ g/ml of Mab J10.4 for 1 h at 4 °C followed by addition of 500 ng of Cs-Cl purified RRV particles for 1 h at 4 °C. Alternatively, the cells were incubated with MEM for 1 h at 4 °C, and then 500 ng of purified RRV viral particles that had been previously incubated with 1  $\mu$ g/ml of soluble JAM-A was added for 1 h at 37 °C. After the incubation period the unbound virus was removed by washing the cells with cold PBS and then the cells were lysed with 125  $\mu$ l of lysis buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100) The percentage of bound virus was calculated by an ELISA as previously described (Zarate et al., 2000).

### Rotavirus infection in cells overexpressing JAM-A

L929 cells were grown on glass coverslips to 70% confluence and were then transfected with 500 ng of a plasmid encoding hJAM-A (pcDNA3.1/JAM-A), hCAR (pcDNA3.1/CAR) or with the empty pcDNA3.1 vector (Barton et al., 2001) using lipofectamine<sup>®</sup>LTX (Life Technologies). At 48 hpt, the transfected cells were infected with 2000 FFUs per well of rotavirus strain RRV, and the infected cells were detected by an immunoperoxidase assay, as described in *Materials and methods*. The transfection efficiency was about 40% as determined by immunofluorescence using Mab J10.4.

### Acknowledgments

We thank Pedro Romero and Rafaela Espinosa for excellent technical assistance with cell culture and virus growth and purification. This paper is dedicated to Pedro Romero, whose technical skills supported much of the work produced in the laboratory of the authors for the last three decades, and who left us prematurely last year. This work was supported by Grants 153639 and 221019 from the National Council for Science and Technology Mexico (CONACYT), and IG-200114 from DGAPA-UNAM. J.T.-F. and D.S.-A. are recipients of a scholarship from CONACYT.

### References

- Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A., Dermody, T.S., 2001. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104, 441–451.
- Bass, D.M., Baylor, M.R., Chen, C., Mackow, E.M., Bremont, M., Greenberg, H.B., 1992. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Investig.* 90, 2313–2320.
- Beau, I., Cotte-Laffitte, J., Amsellem, R., Servin, A.L., 2007. A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. *J. Virol.* 81, 8579–8586.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Garcia-Buey, L., Gondar, V., Lopez-Cabrera, M., Moreno-Otero, R., Majano, P.L., 2012. Role of tight junctions in hepatitis C virus infection. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 104, 255–263.



- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W., 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320–1323.
- Blutt, S.E., Conner, M.E., 2007. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 39–43.
- Boehme, K.W., Lai, C.M., Dermody, T.S., 2013. Mechanisms of reovirus bloodstream dissemination. *Adv. Virus Res.* 87, 1–35.
- Chi, C.N., Bach, A., Stromgaard, K., Gianni, S., Jemth, P., 2012. Ligand binding by PDZ domains. *Biofactors* 38, 338–348.
- Coyne, C.B., Shen, L., Turner, J.R., Bergelson, J.M., 2007. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* 2, 181–192.
- Cuadras, M.A., Arias, C.F., Lopez, S., 1997. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* 71, 9065–9074.
- Cummins, P.M., 2012. Occludin: one protein, many forms. *Mol. Cell Biol.* 32, 242–250.
- Diaz-Salinas, M.A., Romero, P., Espinosa, R., Hoshino, Y., Lopez, S., Arias, C.F., 2013. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *J. Virol.* 87, 1658–1663.
- Diaz-Salinas, M.A., Silva-Ayala, D., Lopez, S., Arias, C.F., 2014. Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *J. Virol.* 88, 4389–4402.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M., 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273, 29745–29753.
- Feng, N., Sen, A., Nguyen, H., Vo, P., Hoshino, Y., Deal, E.M., Greenberg, H.B., 2009. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J. Virol.* 83, 6987–6994.
- Gonzalez-Mariscal, L., Garay, E., Lechuga, S., 2009. Virus interaction with the apical junctional complex. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 14, 731–768.
- Guerrero, C.A., Zarate, S., Corkidi, G., Lopez, S., Arias, C.F., 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74, 9362–9371.
- Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., Lopez, S., 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 84, 9161–9169.
- Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2012. Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485, 256–259.
- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., Jiang, X., 2012. Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* 86, 4833–4843.
- Iden, S., Misselwitz, S., Peddibhotla, S.S., Tuncay, H., Rehder, D., Gerke, V., Robenek, H., Suzuki, A., Ebnet, K., 2012. aPKC phosphorylates JAM-A at Ser285 to promote cell contact maturation and tight junction formation. *J. Cell Biol.* 196, 623–639.
- Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., 2007. Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J. Cell Biol.* 176, 779–786.
- Isa, P., Arias, C.F., Lopez, S., 2006. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27–37.
- Kirchner, E., Guglielmi, K.M., Strauss, H.M., Dermody, T.S., Stehle, T., 2008. Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathog.* 4, e1000235.
- Lopez, S., Arias, C.F., 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 39–66.
- Lopez, T., Silva-Ayala, D., Lopez, S., Arias, C.F., 2012. Methods suitable for high-throughput screening of siRNAs and other chemical compounds with the potential to inhibit rotavirus replication. *J. Virol. Methods* 179, 242–249.
- Luissint, A.C., Nusrat, A., Parkos, C.A., 2014. JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 36, 211–226.
- Makino, A., Shimajima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., Akashi, H., 2006. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J. Virol.* 80, 4482–4490.
- Martinez, M.A., Lopez, S., Arias, C.F., Isa, P., 2013. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J. Virol.* 87, 1115–1122.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F., Lopez, S., 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295, 190–200.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., Rice, C.M., 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882–886.
- Rodgers, L.S., Beam, M.T., Anderson, J.M., Fanning, A.S., 2013. Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. *J. Cell Sci.* 126, 1565–1575.
- Ruiz, A.M., Lopez, I.V., Lopez, S., Espejo, R.T., Arias, C.F., 1988. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J. Virol.* 62, 4331–4336.
- Silva-Ayala, D., Lopez, T., Gutierrez, M., Perrimon, N., Lopez, S., Arias, C.F., 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 10270–10275.
- Stang, E., Kartenbeck, J., Parton, R.G., 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* 8, 47–57.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D., 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 136–141.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126, 741–754.
- Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C.F., López, S., 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* 74, 593–599.
- Zhang, B., Lim, T.S., Vedula, S.R., Li, A., Lim, C.T., Tan, V.B., 2010. Investigation of the binding preference of reovirus sigma1 for junctional adhesion molecule A by classical and steered molecular dynamics. *Biochemistry* 49, 1776–1786.

## **11. Anexo 2**

Este trabajo también dio pie a una revisión sobre la relación que existe entre el ciclo de replicación de diversos virus y las proteínas de uniones estrechas. La revisión en su versión original en inglés se incluye a continuación:

Review

# Tight Junctions Go Viral!

Jesús M. Torres-Flores and Carlos F. Arias \*

Received: 18 June 2015 ; Accepted: 15 September 2015 ; Published: 23 September 2015  
Academic Editor: Alexander Ploss

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001,  
Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; jmtorres@ibt.unam.mx

\* Correspondence: arias@ibt.unam.mx; Tel.: +52-777-3114701; Fax: +52-777-3172388

**Abstract:** Tight junctions (TJs) are highly specialized membrane domains involved in many important cellular processes such as the regulation of the passage of ions and macromolecules across the paracellular space and the establishment of cell polarity in epithelial cells. Over the past few years there has been increasing evidence that different components of the TJs can be hijacked by viruses in order to complete their infectious cycle. Viruses from at least nine different families of DNA and RNA viruses have been reported to use TJ proteins in their benefit. For example, TJ proteins such as JAM-A or some members of the claudin family of proteins are used by members of the *Reoviridae* family and hepatitis C virus as receptors or co-receptors during their entry into their host cells. Reovirus, in addition, takes advantage of the TJ protein Junction Adhesion Molecule-A (JAM-A) to achieve its hematogenous dissemination. Some other viruses are capable of regulating the expression or the localization of TJ proteins to induce cell transformation or to improve the efficiency of their exit process. This review encompasses the importance of TJs for viral entry, replication, dissemination, and egress, and makes a clear statement of the importance of studying these proteins to gain a better understanding of the replication strategies used by viruses that infect epithelial and/or endothelial cells.

**Keywords:** tight junctions; virus; JAM-A; occludin; claudins; ZO-1; PDZ

## 1. Introduction

Viruses, as obliged intracellular parasites, need to take advantage of a wide variety of cellular processes to successfully produce infectious progeny. Interestingly, different viruses can exploit the same cellular process, and the biomolecules related to it, in many different ways. In recent years, increasing evidence of the importance of tight junctions (TJs) for the infection of several viruses has arisen, making it clear that studying the role of the components of this cellular pathway during viral replication is important to achieve a better understanding of how viruses make use of the cellular machinery in order to complete their infectious cycle.

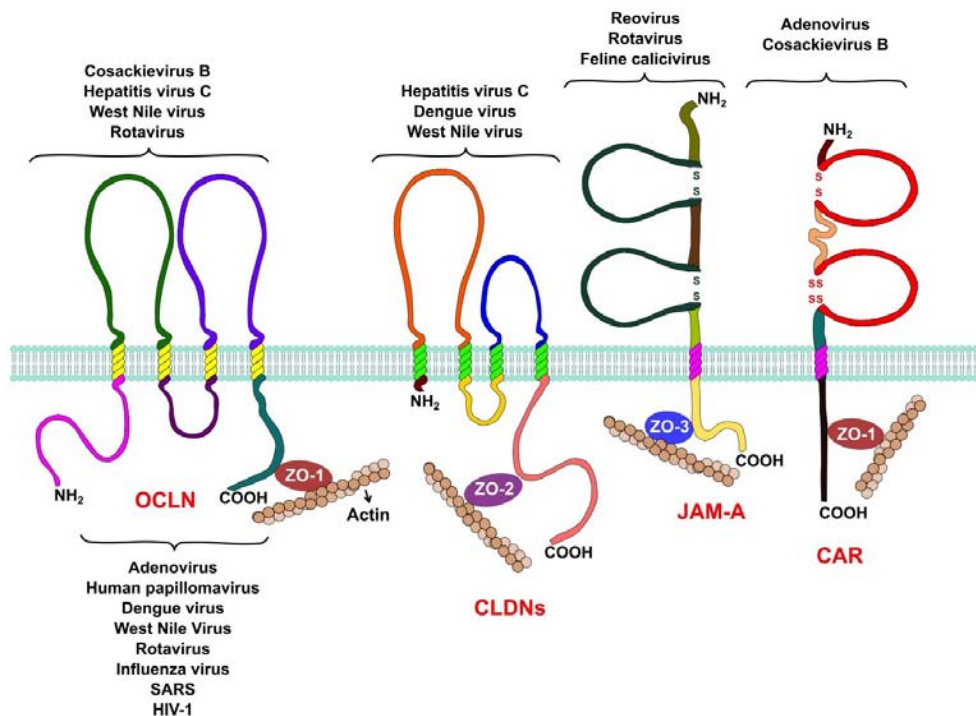
## 2. Tight Junction Structure and Function

TJs are highly specialized membrane domains whose main function is to maintain adjacent cells close enough to avoid the free passage of small molecules, microorganisms, and cells across the paracellular space [1,2]. Another important function of TJs is to provide a physical barrier between the apical and basolateral membrane domains of a polarized epithelial cell, thus preventing the free diffusion of membrane molecules from one domain to the other [3].

Besides the maintenance of cell polarity [4,5], TJs are also involved in several signal transduction pathways [6,7], transmitting signals from the outside to the inside of the cell and *vice versa* to regulate several cellular processes like polarization, proliferation, gene expression and differentiation [8,9].

Structurally, TJs are multiprotein complexes formed by several different integral membrane proteins, which are in turn linked to a series of cytoplasmic adaptor proteins that form a scaffold or plaque whose main function is to join the membrane components of the TJ to the actin cytoskeleton and also allow the recruitment of signaling proteins [2,10,11].

The integral membrane proteins that form the TJ belong to three different families (Figure 1). The Junctional Adhesion Molecules (JAM-A, JAM-B and JAM-C) and the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) belong to the immunoglobulin superfamily. Both proteins span the membrane a single time and have an extracellular domain formed by two Ig-like loops. These proteins also possess a short cytoplasmic tail represented by its C-terminal region, which interacts with other tight junction proteins via PDZ domains [12,13]. Members of this family, like JAM-A and CAR, function as receptors for several viruses.



**Figure 1.** Tight junction proteins and virus replication. Occludin is required by hepatitis C virus, coxsackie B virus, and rotavirus during entry into their host cell. West Nile virus is capable of opening tight junctions by impairing occludin in order to achieve its hematogenous dissemination. Claudins-1, -6, and -9 are used by hepatitis C virus as entry factors. Claudin-1 is also an entry factor for dengue virus, while West Nile virus targets claudin-1 (CLDN-1) to open tight junctions to achieve hematogenous dissemination. Reovirus and feline calicivirus both use JAM-A as a receptor during their entry process, while rotavirus needs JAM-A as a co-receptor. Adenoviruses and coxsackievirus B use CAR as a receptor during their entry. Several proteins of the cytoplasmic plaque that forms tight junctions are involved in viral replication. Rotaviruses require the organization of the plaque provided by the protein zonula occludens protein-1 (ZO-1) for their entry, while other viruses, like influenza, severe acute respiratory syndrome (SARS), and West Nile target this protein to disrupt tight junctions to spread and disseminate. Other plaque proteins, like the multi-PDZ domain protein-1, -2, and -3 (MUPP1, MUPP2, MUPP3), membrane-associated guanylate kinase, WW, and PDZ domain-containing protein-1 (MAGI-1), PALS1-associated TJ protein (PATJ), and zonula occludens protein-2 (ZO-2) are hijacked by adenoviruses and other respiratory viruses, like influenza virus and SARS coronavirus, to open the tight junctions and efficiently exit the airway epithelia. Finally, tight junction proteins are also involved in carcinogenesis, PATJ and MUPP1 are targeted by human papillomaviruses to alter cell polarity, an event that is capable of inducing carcinogenesis in epithelial cells.

The claudin family of proteins is another important component of the TJ. Claudins are tetraspanning proteins whose main function is to regulate the passage of ions across the paracellular space [14–16]. To date, 27 claudins are known in humans and their differential expression in different epithelia allows the paracellular transport of specific ions in each tissue.

The TJ-associated marvel proteins (TAMPs) are the last transmembrane component of the TJs. This family of proteins has three members, occludin, tricellulin, and marvelD3. A lot of research has been conducted to determine the functions of occludin; even though it is not essential for the formation of TJs [17] this protein is capable of regulating the transport of some small ions across the paracellular space [18]. Occludin as other TAMPs, has a MARVEL domain, which have been shown to associate with cholesterol rich membrane domains and are thought to be involved in the biogenesis of endocytic vesicles and in the organization of specialized membrane domains like the TJs [19]. When the expression of occludin is silenced in epithelial cells by RNA interference, the activation of the Rho GTPase RhoA is impaired under certain stimuli, suggesting that it may also play a role in signal transduction [20]. The roles of both tricellulin and marvelD3 at the TJ are similar to that of occludin but their functions do not overlap [21].

To establish a connection between the outside and the inside of the cell, transmembrane TJ proteins interact with cytoplasmic proteins via the PDZ binding domains (PSD/DlgA/ZO-1) in their cytoplasmic regions. Cytoplasmic proteins like ZO-1, ZO-2, and ZO-3 [22,23], Par-3 and Par-6 [24–26], and MAGI proteins [27] also possess PDZ domains and thus readily interact with the transmembrane components of the TJ. The cytoplasmic proteins that form the TJ serve as a scaffold where other signaling proteins such as protein kinase C (PKC), Rho, Rab, and Ras GTPases, and several other proteins that are important for signal transduction from and to the TJ are recruited. PDZ domain containing proteins, such as ZO-1, also play an important role in the assembly of TJs [28].

### 3. Viruses Open the Gate: Tight Junctions during Viral Entry

Many viruses that infect epithelia, like influenza viruses for example, have evolved to use receptors or co-receptors that are readily available on the apical domain of the epithelial cells [29]. On the other hand, many other viruses require basolateral molecules as their attachment and entry receptors [30,31], which are usually inaccessible to viral particles because they are buried under the TJs. To overcome this problem, some viruses have developed elegant strategies to open the TJs in order to reach their receptors, while others are capable of using TJ proteins as receptors.

The first TJ protein that was identified as a viral receptor was the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). This protein, which belongs to the immunoglobulin superfamily, is usually confined within the TJ and is not readily accessible for viruses to initiate infection. As its name indicates, there are two different viruses known to use CAR as a receptor, adenoviruses and coxsackie B viruses, and they use CAR during their entry in different ways.

Several types of adenoviruses are capable of binding CAR with high affinity through the knob domain of the fiber protein of the virus [32,33]. The binding of adenovirus to the cell surface and its entry into the cell are two separate but highly coordinated events. Once adenovirus binds CAR it is capable of binding its entry receptor; several basolateral molecules such as integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  [34],  $\alpha 5 \beta 1$  [35], as well as  $\alpha v \beta 1$  [36] and  $\alpha 3 \beta 1$  [37], have all been found to mediate adenovirus entry, clearly showing how important it is for adenoviruses to open the TJs in order to reach these molecules.

In recent years, a splice isoform of CAR (CAR<sup>EX8</sup>) has been associated to the entry of adenoviruses through the apical surface of the airway epithelia [38]. There are two transmembrane splice isoforms of CAR, CAR<sup>EX7</sup> and CAR<sup>EX8</sup>, which differ only in the last residues of their cytoplasmic domain [39]. This slight difference causes CAR<sup>EX8</sup> to localize at the apical surface of polarized epithelial cells [38]. IL-8 has been shown to enhance adenovirus entry in a dose-dependent manner, primarily by increasing the expression of CAR<sup>EX8</sup> at the apical domain [38]. This observation

suggests that adenoviruses might take advantage of this host innate immune response, induced by bacteria or other IL-8 stimulating factors, to facilitate infection [38].

Coxsackieviruses, as some adenoviruses that are capable of causing diarrhea (serotypes 40 and 41), enter their host through the oral route, and have to cross the intestinal mucosa in order to reach the bloodstream to initiate viremia and spread to other body sites. To do so, these viruses must gain access to the TJ where they can bind CAR and enter the cell [40].

Not all coxsackievirus strains are able to readily infect the intestinal epithelium, but it has been shown that the strains that are capable of doing so first bind to a protein located in the apical face of the intestinal cells: the decay accelerating factor (DAF) [41,42]. The interaction of viral particles with DAF causes DAF to relocalize into lipid rafts, where it is able to activate the tyrosine kinase c-Abl, which in turn activates the Rho GTPase Rac. The activation of Rac induces a rearrangement of the actin cytoskeleton that facilitates the transport of DAF bound particles into the TJ where the virus can bind CAR and enter the cell [43].

The binding of coxsackie B viruses to CAR induces a series of conformational changes in the viral particle that are critical for the entry and uncoating of the virus. One striking observation is that, as adenoviruses, coxsackieviruses are not endocytosed bound to either CAR or DAF, in fact, these two proteins remain at the cellular membrane while coxsackieviruses are internalized [44]. It is worth mentioning that the endocytosis of coxsackie B viruses is coupled with the internalization of another TJ protein, occludin. It is not clear if the viral particles enter the cell together with occludin molecules but they have been shown to co-localize in vesicles inside the cell [44].

Both occludin and coxsackie B virus particles have been shown to enter the cell through different internalization pathways. On the one hand, occludin enters the cell via macropinocytosis, while the viral particles enter the cell through caveolin-mediated endocytosis [44]. Interestingly, the use of drugs that impair the macropinocytosis of occludin also impairs virus internalization; the inverse effect was observed when caveolin-mediated endocytosis of viral particles was blocked. Whether the virus activates the endocytosis of TJs to enter the cell or it promotes the recruitment of caveolin or other regulatory molecules into the vicinity of the TJ still needs to be determined [44]. Interestingly, the entry of echovirus 11 into polarized epithelial cells is dependent on the binding of the virus to DAF. A mutant strain incapable of binding DAF enters the cell through the apical surface, while the wild type strain, after binding DAF, is relocalized to the TJs to enter the cell through the basolateral membrane [45].

A third virus whose receptors lie within the TJ is hepatitis C virus (HCV). Like many other viruses, HCV is able to bind several different molecules on the cell surface, including CD81, SR-BI, and LDLR [46,47]. It was recently demonstrated that the TJ protein claudin-1 is also important for HCV entry even though the virus has not been shown to bind this protein. The localization of claudin-1 in TJs is important for the entry of HCV particles into the cell, since mutations in the first extracellular loop that prevent claudin-1 from establishing cell–cell contacts also impair HCV entry [48]. Claudin-1 has been shown to associate with CD81 to promote virus entry, a property that is also shared with claudin-6 and claudin-9, which have also been found to be important for the internalization of HCV [49]. Another TJ protein associated with the entry of HCV virus is occludin; when this protein is overexpressed in human cells that are not susceptible to HCV infection, the uptake of the virus is highly increased [50]. The step at which occludin participates in the entry of HCV has yet to be determined. Recently, it was demonstrated that dengue virus protein prM/M can also bind claudin-1 and the knockdown of this protein in Huh 7.5 cells prevents the virus from entering them [51].

Rotaviruses are also capable of using TJ proteins for their entry. JAM-A, occludin, and ZO-1 were all shown to be important for virus internalization [52]. Interestingly, the C-terminal domain of JAM-A seems to be important for the entry of rotaviruses into non-polarized MA104 cells, suggesting that as for coxsackievirus, a signaling pathway associated to a member of this immunoglobulin superfamily is required [52]. The localization of JAM-A in the cell-cell contacts of MA104 cells is

also necessary for the entry of rotaviruses. This localization depends on the activity of ZO-1, since when the expression of ZO-1 was silenced using RNA interference, JAM-A was not longer detectable on the cell-cell contacts, and the infectivity of the virus was highly diminished [52]. JAM-A is also a functional receptor for feline calicivirus and there is a clear association between the origin (animal species) of JAM-A and the cellular tropism of the virus [53].

TJs are considered a primary barrier for pathogens due to the fact that they closely seal epithelial cells together so that neither bacteria nor viruses can access the deeper cell layers that lie beneath epithelia. The fact that many viruses have evolved to use TJ proteins as receptors for cell entry may be a way of overcoming their barrier function, using in this way the host defense machinery to their own advantage. The organization of TJs and the proteins that constitute them is specific for each type of epithelium. This might also give viruses that use TJ proteins as receptors some sort of tissue specificity.

#### 4. Tight Junctions: Opening the Gates into the Bloodstream

Several studies have clearly demonstrated the importance of JAM-A as a cellular receptor for reovirus [54]. The overexpression of JAM-A in cells not susceptible to reovirus infection makes them capable of supporting viral replication [54]. The viral particles bind JAM-A through the viral protein  $\sigma 1$  with such a high affinity that viral particles are capable of displacing JAM-A/JAM-A interactions [55].

Even though it can be used as a receptor in cultured cells, JAM-A is dispensable for viral replication in the intestine. However, one of the most interesting facts about the association between JAM-A and reovirus *in vivo* involves the hematogenous dissemination of the virus. It was demonstrated that wild-type mice that were orally inoculated with the virus developed central nervous system conditions that were not observed in JAM-A deficient mice (JAM-A  $-/-$ ) inoculated through the same route [56,57]. When the virus was inoculated directly into the brain, both JAM-A deficient and wild-type mice developed an encephalitis-like condition that suggested that brain cells are susceptible to reovirus infection [58]. These results clearly demonstrated that endothelial JAM-A is necessary for the entry and egress of reovirus into the bloodstream [59].

Several neurotropic viruses have been shown to modify the structure of the endothelial TJs in order to gain access into the bloodstream. West Nile virus is capable of doing so by promoting the degradation of multiple TJ proteins, like JAM-A, ZO-1, occludin, and claudin-1 [60]. A similar effect has been observed during dengue virus infection, where alterations in the actin cytoskeleton, adherens junctions, and a decrease in the expression levels of ZO-1, which alters the integrity of TJs, occurs in endothelial cells [61]. Other viruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) and human T leukemia virus (HTLV) have also been shown to disrupt the endothelial TJs to achieve hematogenous dissemination [62,63].

#### 5. It Is Not All about the Entry

TJ proteins have been clearly associated to the entry process of several viruses, nevertheless, the cytoplasmic proteins that form the TJ have also been involved in other viral processes. Several membrane and intracellular proteins contain a specialized domain, PDZ, involved in protein-protein interactions and signaling events. Proteins with PDZ domains have been related to the formation and maintenance of TJs and to the establishment of cell polarity, among other functions [64].

In recent years, the role of TJ proteins that contain PDZ domains in viral replication has been established, increasing the evidence of the importance of TJs for the establishment of productive viral infections. Several viral proteins are known to contain PDZ domain-binding motifs or PBMs, but the first evidence of the interactions between PDZ containing proteins and PBMs arose from the study of two oncogenic viruses, adenoviruses and human papillomaviruses (HPV). Adenovirus 9 E4-ORF can bind 4 TJ proteins, MUPP1, MAGI-1, PATJ, and ZO-2 [65–67], controlling in this way the formation of TJs. In epithelial cells, the presence of E4-ORF causes the disruption of TJs without

causing a disruption of the adherens junction. The disruption of the TJ also causes an impairing of the formation of cell polarity. On the other hand, the HPV E6 protein, which can bind the TJ proteins PATJ and MUPP1, targets them for degradation and causes in this way an alteration of the membrane composition and cell polarity in infected cells. A possible association between the loss of cell polarity and the carcinogenesis induced by HPV has been suggested [68].

Two viruses that cause respiratory illnesses, influenza A viruses and coronaviruses (specifically, SARS coronavirus), have proteins capable of targeting members of the MAGUK family of proteins (MUPP 1, MUPP 2, MUPP 3, or ZO-1) causing in this way the disruption of TJs and alterations in cellular polarity. The functional implications of these changes have yet to be determined, but one possibility is that the disruption of TJs is necessary for the spread of these viruses outside the respiratory tract [69,70].

Infections by herpes simplex virus-1 (HSV-1) and herpes simplex virus-2 (HSV-2) are the most common opportunistic infections in HIV-1 infected patients. The risk of the onset of HSV infections in HIV positive patients has been related to the effect of HIV over the immune system. A recent study has also demonstrated that HIV proteins tat and gp120 are capable of disrupting TJs, facilitating the paracellular spread of both HSV-1 and HSV-2 [71].

The role of several viral proteins with PBM domains has yet to be determined but there is clear evidence of the importance of TJs not only for virus cell entry but also for their spread inside their hosts.

## 6. Modification of TJs for Viral Egress

Viruses are also capable of disrupting the TJs during their exit, in order to successfully egress the epithelia they infect. There are just a few examples of viruses that open the TJ during late steps of their replication cycle. As previously mentioned, the binding of adenovirus particles to their receptor CAR causes a disruption of TJs. This disruption is also exploited by adenoviruses during the late stages of viral replication, since binding of the extracellular adenovirus fiber protein (synthesized *de novo* in infected cells) to CAR causes a disruption of the TJs, allowing the viral particles to exit the respiratory epithelia through the basolateral membrane without getting trapped in the paracellular space [72].

As has been reviewed, the study of TJs is of great relevance to understand the mechanisms used by viruses to successfully infect, replicate, and disseminate within their hosts. Likewise, the characterization of the different stages of viral replication has allowed us to better understand the composition and function of TJs. Table 1 shows a summary of the viruses and the TJ proteins they use to efficiently replicate.

**Table 1.** Summary of the tight junction proteins used by different viruses to efficiently replicate.

	Virus	Target TJ Protein	Function	Reference
DNA viruses	Adenovirus	CAR (CAR <sup>EX7</sup> , CAR <sup>EX8</sup> )	Viral receptor	[32,33,38,39]
		MUPP-1, MAGI-1, PATJ, ZO-2	Impair cell polarity for viral egress and dissemination	[65–67,72]
	Human poliovirus	PAT-1, MUPP1	Alteration of cell polarity, carcinogenesis?	[68]
RNA viruses	Coxsackievirus B	CAR	Viral receptor	[40,43]
		Occludin	Viral internalization	[50]
	Human hepatitis C virus	CLDN-1, CLDN-6, CLDN-9	Viral entry	[48,49]
		Occludin	Viral entry	[50]
	Dengue virus	CLDN-1	Viral entry	[51]
		ZO-1	Alteration of tight junction integrity	[61]
West Nile virus		JAM-A, ZO-1, Occludin, CLDN-1	Impair tight junctions for hematogenous dissemination	[60]
Rotavirus	JAM-A, Occludin, ZO-1	Co-receptors	[52]	



Table 1. Cont.

	Virus	Target TJ Protein	Function	Reference
RNA viruses	Reovirus	JAM-A	Receptor, hematogenous dissemination	[54–59]
	Feline calicivirus	JAM-A	Receptor	[53]
	Influenza virus	MUPP1, MUPP2, MUPP3, ZO-1	Alteration of cell polarity, spread outside the respiratory tract?	[69]
	Severe acute respiratory syndrome virus	MUPP1, MUPP2, MUPP3, ZO-1	Alteration of cell polarity, spread outside the respiratory tract?	[70]
	Human immunodeficiency virus 1	Several TJ proteins involved	Disruption of tight junctions, hematogenous dissemination,	[62,63,71]

**Acknowledgments:** We want to thank C. Paulina Torres for making the figure for this review. Work in our laboratory relevant to this article was supported by grants 153639 and 221019 from the National Council for Science and Technology (Conacyt), Mexico, and grant IG-200114 from DGAPA-UNAM.

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Steed, E.; Balda, M.S.; Matter, K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 142–149. [[CrossRef](#)]
2. Shen, L. Tight junctions on the move: Molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1258*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Van Meer, G.; Simons, K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* **1986**, *5*, 1455–1464.
4. Shin, K.; Fogg, V.C.; Margolis, B. Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 207–235. [[PubMed](#)]
5. Cerejido, M.; Contreras, R.G.; Gonzalez-Mariscal, L. Development and alteration of polarity. *Annu. Rev. Physiol.* **1989**, *51*, 785–795. [[PubMed](#)]
6. Terry, S.; Nie, M.; Matter, K.; Balda, M.S. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology* **2010**, *25*, 16–26. [[PubMed](#)]
7. González-Mariscal, L.; Tapia, R.; Chamorro, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 729–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zihni, C.; Balda, M.S.; Matter, K. Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. *J. Cell Sci.* **2014**, *15*, 3401–3413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tsukita, S.; Yamazaki, Y.; Katsuno, T.; Tamura, A. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **2008**, *27*, 6930–6938. [[CrossRef](#)]
10. Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*. [[CrossRef](#)]
11. Furuse, M.; Izumi, Y.; Oda, Y.; Higashi, T.; Iwamoto, N. Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers* **2014**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Severson, E.A.; Parkos, C.A. Structural determinants of Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) function and mechanisms of intracellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 701–707. [[PubMed](#)]
13. Garrido-Urbani, S.; Bradfield, P.F.; Imhof, B.A. Tight junction dynamics: The role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell Tissue Res.* **2014**, *355*, 701–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Markov, A.G.; Aschenbach, J.R.; Amasheh, S. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life* **2015**, *67*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Suzuki, H.; Tani, K.; Tamura, A.; Tsukita, S.; Fujiyoshi, Y. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 291–297. [[PubMed](#)]
16. Angelow, S.; Ahlstrom, R.; Yu, A.S. Biology of claudins. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2008**, *295*, F867–F876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Schulzke, J.D.; Gitter, A.H.; Mankertz, J.; Spiegel, S.; Seidler, U.; Amasheh, S.; Saitou, M.; Tsukita, S.; Fromm, M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1669*, 34–42. [[PubMed](#)]
18. Yu, D.; Turner, J.R. Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 709–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sánchez-Pulido, L.; Martín-Belmonte, F.; Valencia, A.; Alonso, M.A. MARVEL: A conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 599–601. [[CrossRef](#)]
20. Yu, A.S.; McCarthy, K.M.; Francis, S.A.; McCormack, J.M.; Lai, J.; Rogers, R.A.; Lynch, R.D.; Schneeberger, E.E. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2005**, *288*, C1231–C1241. [[PubMed](#)]
21. Raleigh, D.R.; Marchiando, A.M.; Zhang, Y.; Shen, L.; Sasaki, H.; Wang, Y.; Long, M.; Turner, J.R. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 1200–1213. [[PubMed](#)]
22. Fanning, A.S.; Anderson, J.M. Zonula Occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1165*, 113–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Van Itallie, C.M.; Fanning, A.S.; Bridges, A.; Anderson, J.M. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3930–3940. [[CrossRef](#)]
24. Joberty, G.; Petersen, C.; Gao, L.; Macara, I.G. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 531–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ebnet, K.; Schulz, C.U.; Meyer Zu Brickwedde, M.K.; Pendl, G.G.; Vestweber, D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27979–27988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gao, L.; Macara, I.G. Isoforms of the polarity protein par6 have distinct functions. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41557–41562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dobrosotskaya, I.; Guy, R.K.; James, G.L. MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31589–31597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rodgers, L.S.; Beam, M.T.; Anderson, J.M.; Fanning, A.S. Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 1565–1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chan, M.C.; Chan, R.W.; Yu, W.C.; Ho, C.C.; Chui, W.H.; Lo, C.K.; Yuen, K.M.; Guan, Y.; Nicholls, J.M.; Peiris, J.S. Influenza H5N1 virus infection of polarized human alveolar epithelial cells and lung microvascular endothelial cells. *Respir. Res.* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Realpe, M.; Espinosa, R.; López, S.; Arias, C.F. Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells. *Virus Res.* **2010**, *147*, 231–241. [[CrossRef](#)]
31. Excoffon, K.J.; Guglielmi, K.M.; Wetzell, J.D.; Gansemer, N.D.; Campbell, J.A.; Dermody, T.S.; Zabner, J. Reovirus preferentially infects the basolateral surface and is released from the apical surface of polarized human respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 1189–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lenman, A.; Liaci, A.M.; Liu, Y.; Årdahl, C.; Rajan, A.; Nilsson, E.; Bradford, W.; Kaeshammer, L.; Jones, M.S.; Frängsmyr, L.; *et al.* Human adenovirus 52 uses sialic acid-containing glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Freimuth, P.; Philipson, L.; Carson, S.D. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *323*, 67–87. [[PubMed](#)]
34. Wickham, T.J.; Mathias, P.; Cheresch, D.A.; Nemerow, G.R. Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **1993**, *73*, 309–319. [[CrossRef](#)]
35. Davison, E.; Diaz, R.M.; Hart, I.R.; Santis, G.; Marshall, J.F. Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *J. Virol.* **1997**, *71*, 6204–6207.
36. Li, E.; Brown, S.L.; Stupack, D.G.; Puente, X.S.; Cheresch, D.A.; Nemerow, G.R. Integrin  $\alpha(v)\beta 1$  is an adenovirus coreceptor. *J. Virol.* **2001**, *75*, 5405–5409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Salone, B.; Martina, Y.; Piersanti, S.; Cundari, E.; Cherubini, G.; Franqueville, L.; Failla, C.M.; Boulanger, P.; Saggio, I. Integrin  $\alpha 3 \beta 1$  is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5. *J. Virol.* **2003**, *77*, 13448–13454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Kotha, P.L.; Sharma, P.; Kolawole, A.O.; Yan, R.; Alghamri, M.S.; Brockman, T.L.; Gomez-Cambronero, J.; Excoffon, K.J. Adenovirus entry from the apical surface of polarized epithelia is facilitated by the host innate immune response. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Excoffon, K.J.; Bowers, J.R.; Sharma, P. 1. Alternative splicing of viral receptors: A review of the diverse morphologies and physiologies of adenoviral receptors. *Recent Res. Dev. Virol.* **2014**, *9*, 1–24. [[PubMed](#)]
40. Coyne, C.B.; Bergelson, J.M. CAR: A virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 869–882. [[CrossRef](#)]
41. Milstone, A.M.; Petrella, J.; Sanchez, M.D.; Mahmud, M.; Whitbeck, J.C.; Bergelson, J.M. Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J. Virol.* **2005**, *79*, 655–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Shieh, J.T.C.; Bergelson, J.M. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **2002**, *76*, 9474–9480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Coyne, C.B.; Bergelson, J.M. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **2006**, *124*, 119–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Coyne, C.B.; Shen, L.; Turner, J.R.; Bergelson, J.M. Coxsackievirus entry from epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* **2007**, *2*, 181–192. [[CrossRef](#)]
45. Sobo, K.; Rubbia-Brandt, L.; Brown, T.D.K.; Stuart, A.D.; McKee, T.A. Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12376–12386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tong, Y.; Zhu, Y.; Xia, X.; Liu, Y.; Feng, Y.; Hua, X.; Qi, Z.T. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2793–2802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Monazahian, M.; Böhme, I.; Bonk, S.; Koch, A.; Scholz, C.; Grethe, S.; Thomssen, R. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **1999**, *57*, 223–229. [[CrossRef](#)]
48. Von Hahn, T.; Rice, C.M. Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 3689–3693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zheng, A.; Yuan, F.; Li, Y.; Zhu, F.; Hou, P.; Li, J.; Song, X.; Ding, M.; Deng, H. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J. Virol.* **2007**, *81*, 12465–12471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ploss, A.; Evans, M.J.; Gaysinskaya, V.A.; Panis, M.; You, H.; de Jong, Y.P.; Rice, C.M. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **2009**, *457*, 882–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Che, P.; Tang, H.; Li, Q. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology* **2013**, *446*, 303–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Torres-Flores, J.M.; Silva-Ayala, D.; Espinoza, M.A.; López, S.; Arias, C.F. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology* **2015**, *475*, 172–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Makino, A.; Shimojima, M.; Miyazawa, T.; Kato, K.; Tohya, Y.; Akashi, H. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J. Virol.* **2006**, *80*, 4482–4490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Barton, E.S.; Forrest, J.C.; Conolly, J.L.; Chappell, J.D.; Liu, Y.; Schnell, F.J.; Nusrat, A.; Parkos, C.A.; Dermody, T.S. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* **2001**, *104*, 441–451. [[CrossRef](#)]
55. Kirchner, E.; Guglielmi, K.M.; Strauss, H.M.; Dermody, T.S.; Stehle, T. Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Antar, A.A.; Konopka, J.L.; Campbell, J.A.; Henry, R.A.; Perdigoto, A.L.; Carter, B.D.; Pozzi, A.; Abel, T.W.; Dermody, T.S. Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 59–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Boehme, K.W.; Lai, C.M.; Dermody, T.S. Mechanisms of reovirus bloodstream dissemination. *Adv. Virus Res.* **2013**, *87*, 1–35. [[PubMed](#)]
58. Konopka-Anstadt, J.L.; Mainou, B.A.; Sutherland, D.M.; Sekine, Y.; Strittmatter, S.M.; Dermody, T.S. The Nogo receptor NgR1 mediates infection by mammalian reovirus. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 681–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Lai, C.M.; Boehme, K.W.; Pruijssers, A.J.; Parekh, V.V.; van Kaer, L.; Parkos, C.A.; Dermody, T.S. Endothelial JAM-A promotes reovirus viremia and bloodstream dissemination. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 383–393. [[CrossRef](#)]

60. Roe, K.; Kumar, M.; Lum, S.; Orillo, B.; Nerurkar, V.R.; Verma, S. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 1193–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kanlaya, R.; Pattanakitsakul, S.N.; Sinchaikul, S.; Chen, S.T.; Thongboonkerd, V. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2551–2562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Afonso, P.V.; Ozden, S.; Prevost, M.C.; Schmitt, C.; Seilhean, D.; Weksler, B.; Couraud, P.O.; Gessain, A.; Romero, I.A.; Ceccaldi, P.E. Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: Role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 2576–2583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kanmogne, G.D.; Schall, K.; Leibhart, J.; Knipe, B.; Gendelman, H.E.; Persidsky, Y. HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances monocyte migration across blood-brain barrier: Implication for viral neuropathogenesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 123–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lee, H.J.; Zheng, J.J. PDZ domains and their binding partners: Structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal.* **2010**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Glaunsinger, B.A.; Lee, S.S.; Thomas, M.; Banks, L.; Javier, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* **2000**, *19*, 5270–5280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Glaunsinger, B.A.; Weiss, R.S.; Lee, S.S.; Javier, R. Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5578–5586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lee, S.S.; Glaunsinger, B.; Mantovani, F.; Banks, L.; Javier, R.T. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* **2000**, *74*, 9680–9693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Latorre, I.J.; Roh, M.H.; Frese, K.K.; Weiss, R.S.; Margolis, B.; Javier, R.T. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4283–4293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Golebiewski, L.; Liu, H.; Javier, R.T.; Rice, A.P. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10639–10648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Teoh, K.T.; Siu, Y.L.; Chan, W.L.; Schlüter, M.A.; Liu, C.J.; Peiris, J.S.; Bruzzone, R.; Margolis, B.; Nal, B. The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 3838–3852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Sufiawati, I.; Tugizov, S.M. HIV-associated disruption of tight and adherens junctions of oral epithelial cells facilitates HSV-1 infection and spread. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Walters, R.W.; Freimuth, P.; Moninger, T.O.; Ganske, I.; Zabner, J.; Welsh, M.J. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* **2002**, *110*, 789–799. [[CrossRef](#)]



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).