

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE
ENTRADA DE LA CEPA HUMANA
DE ROTAVIRUS WA

T E S I S

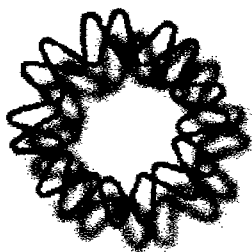
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MICHELLE GUTIÉRREZ MAYRET

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN



CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Comité tutorial:

Dr. Gustavo Pedraza Alva
Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Dra. Susana López Charretón

Jurado de examen:

Dra. Carmen Beltrán Núñez
M.C. Maria del Carmen Quinto Hernández
Dra. Leonor Pérez Martínez
Dra. Susana López Charretón
Dr. Fernando Esquivel

Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de CONACYT (número de registro 194561)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su cariño y apoyo sin medida

A toda mi familia, en especial a “la Flaca” donde quiera que se encuentre

A mis adoradas sobrinas: Alana, Aranza e Ingrid por enseñarme lo bonito que es el mundo y hacerme reír con sus loqueras

A Juan por todo su amor y compañerismo. Gracias por motivarme a ser mejor cada día!!

A Susana por todo lo que me ha enseñado

A todos los miembros del laboratorio Arias-López (Ernesto, Pavel, Rafa, Don Pedrito, Margarito, Vicenta, Tomás, Miguel, Rocío,...) por sus críticas y consejos

A Hilda por su amistad, consejos, apoyo. A Rosa por ser tan divertida.

A mis entrañables amigos Luiggi y Merna por los buenos ratos

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

Gracias a todos

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	5
Generalidades de Rotavirus.....	5
Entrada de Rotavirus a la célula.....	6
Endocitosis como vía de entrada de virus	11
Endocitosis mediada por clatrina	15
Endocitosis mediada por caveolas.....	18
Endocitosis independiente de clatrina y de dinamina	18
Endocitosis independiente de clatrina pero dependiente de dinamina.....	19
Macropinocitosis	20
II. ANTECEDENTES	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVO GENERAL	23
V. OBJETIVOS PARTICULARES	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
VII. RESULTADOS	30
1. Dependencia de pH	30
a. Compuestos que evitan la acidificación de los endosomas.....	30
b. Pre-incubación en pH ácido	33
c. Papel de las catepsinas	34
2. Papel de la endocitosis mediada por clatrina.....	36
a. Tratamientos con sacarosa.....	36
b. Dominantes negativas de eps15 y dinamina.....	39
VIII.DISCUSIÓN	44
IX. RESUMEN	51
X.CONCLUSIONES	52
XI. ANEXOS	53
Anexo 1. Efecto de la expresión de la mutante de eps15 en la infectividad de rotavirus.....	53
Anexo 2. Efecto de la expresión de la mutante de dinamina en la infectividad de rotavirus.....	56
XII. REFERENCIAS	59

I. INTRODUCCIÓN

Generalidades de Rotavirus

El principal agente etiológico de gastroenteritis en niños menores de 2 años es un miembro de la familia *Reoviridae*, el rotavirus [1]. Cada año, rotavirus causa a nivel mundial más de 2 millones de hospitalizaciones y alrededor de 400,000 muertes en niños menores de 5 años de edad [1]. Los síntomas que se presentan durante la infección son diarrea severa, vómito y fiebre. La mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la fuerte deshidratación que provoca la infección por lo que es muy importante mantener hidratados a los niños. Rotavirus se caracteriza por tener un genoma compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena rodeado por tres capas concéntricas de proteína. Además, este virus carece de una envoltura lipídica (figura 1). La capa más externa tiene un papel muy importante en la infectividad viral ya que está involucrada tanto en la unión como en la entrada de rotavirus. Esta capa está constituida por las proteínas VP4 y VP7. Se ha visto que la infectividad de este virus se incrementa por el procesamiento del virus con tripsina, la cual corta a VP4 en dos polipéptidos de menor peso molecular llamados VP8 y VP5 (figura 2). El mecanismo por el cual el corte proteolítico de VP4 activa la infectividad del virus aún no se conoce [2]. En cuanto a la otra proteína de la capa externa, la glicoproteína viral VP7, se ha reportado que esta proteína interactúa con los receptores celulares de rotavirus después de la unión inicial del virus con la superficie celular [3] y se sabe que presenta sitios de unión a las integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ (figura 2). Además, esta proteína viral une calcio el cual es necesario para la estabilidad de la partícula [4].

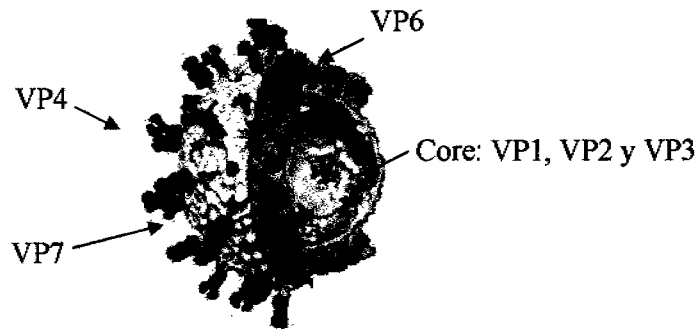


Figura 1. Reconstrucción tridimensional de rotavirus a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. Se pueden observar las tres capas concéntricas de la partícula viral. La capa más interna esta formada por las proteínas virales VP1, VP2 y VP3, la capa intermedia esta compuesta por la proteína viral VP6 mientras que la capa externa esta formada por las proteínas VP7 y VP4. Esta última es la que forma las espículas del virus

Entrada de Rotavirus a la célula

Rotavirus infecta *in vivo* a los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre rotavirus se han llevado a cabo en la línea celular MA104 proveniente de riñón de mono verde africano la cual además de ser susceptible a la infección por este virus permite la aplicación de técnicas como la transfección. Para entrar a la célula, rotavirus requiere de varios pasos (figura 3). El primero, es su activación por tripsina en donde se corta específicamente la proteína VP4 en VP5 y VP8. Una vez activado, el virus se une a la célula blanco a través del reconocimiento de los receptores presentes en la superficie celular. La presencia de dichos receptores determina en gran medida que tipo celular puede infectar un virus. Se sabe que para rotavirus el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ y la proteína de choque térmico Hsc70 están involucradas como sus receptores.

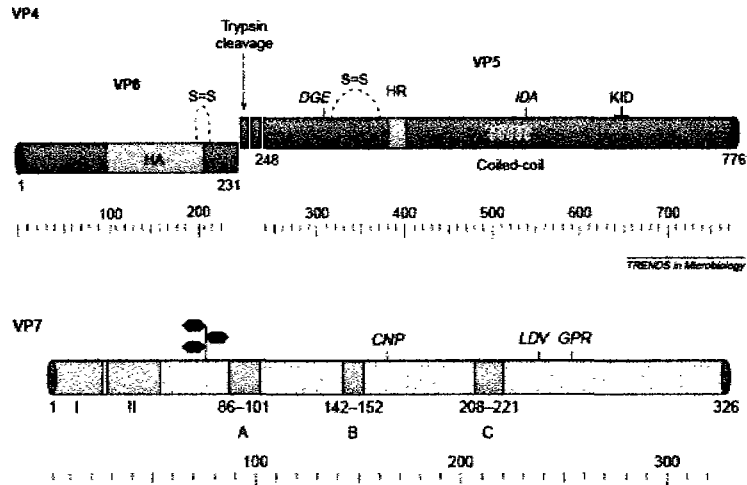


Figura 2. Representación esquemática de VP4 y VP7. VP4 tiene 3 sitios susceptibles a tripsina (Arg241>Arg231>Arg247). En la región de VP8 esta presente el sitio de unión a ácido siálico (HA) mientras que en VP5 están los sitios de unión a las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ (DGE e IDA) y a Hsc70 (KID). Además, en esta región se encuentra una secuencia hidrofóbica que podría funcionar como péptido de fusión (HR). VP7 es una proteína glicosilada que tiene sitios de unión a las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (LDV), $\alpha \times \beta 2$ (GPR) y $\alpha \nu \beta 3$ (CNP). Además, tiene tres dominios antigénicos (A, B y C) localizados en las posiciones 86 a 101, 142 a 152 y 208 a 221, respectivamente [5]

En el caso del ácido siálico, sólo algunas cepas de rotavirus lo requieren para unirse a la superficie celular, a estas cepas se les llama sensibles a neuraminidasa (que es una enzima que remueve los ácidos siálicos de la superficie de las células) mientras que hay otras cepas que no lo utilizan y se les conoce como resistentes a neuraminidasa (tabla 1). La interacción de rotavirus con el ácido siálico se da a través del dominio VP8 de VP4 (figura 2).

Por otro lado, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \times \beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ han sido implicadas como receptores de rotavirus tanto para las cepas sensibles como para las resistentes a neuraminidasa (tabla 1) y también se han encontrado varios sitios de unión a integrinas en las proteínas virales VP4 y VP7 (figura 2) [6, 7]. Cuando la interacción de las proteínas virales con las integrinas es inhibida, usando péptidos que mimetizan los sitios

de unión a las integrinas o anticuerpos contra las integrinas, la infectividad del virus disminuye [3, 8]. Sin embargo, existen cepas de rotavirus que no utilizan estas integrinas como receptores (tabla 2) pero pudieran utilizar otra (s) molécula (s) diferente.

Por último, también se ha encontrado que la proteína de choque térmico Hsc70 juega un papel importante como receptor para rotavirus. Esta proteína actúa como un receptor post-unión para las cepas de rotavirus sensibles y resistentes a neuraminidasa [9]. Esto se ha encontrado por la observación de que los péptidos sintéticos que mimetizan la región de VP5, la cual interactúa con Hsc70 (figura 2), o anticuerpos contra esta proteína bloquean la infectividad de los rotavirus, pero no su unión a la célula [10].

Tabla 1. Clasificación de distintas cepas de rotavirus de acuerdo a sus requerimientos de integrinas y de ácido siálico

Cepa (Origen)	Neuraminidasa	Integrina
Wa (Humano)	Resistente	Dependiente
UK (Bovino)	Resistente	Independiente
RRV (Simio)	Sensible	Dependiente
TFR (Porcina)	Sensible	Independiente

Se ha sugerido que los microdominios lipídicos, también conocidos como balsas lipídicas, participan en la entrada de rotavirus a la célula ya que hay una severa

disminución en la infectividad viral al quitar el colesterol de la membrana (lo que resulta en la desestabilización de las balsas lipídicas) [11, 12]. La presencia de las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$, de la proteína Hsc70, así como de partículas virales infecciosas, en microdominios lipídicos, apoyan la idea de que las balsas lipídicas son importantes en la entrada de rotavirus [13].

Con los resultados obtenidos hasta ahora, se ha propuesto un modelo para las interacciones tempranas de rotavirus con su célula hospedera (figura 3). Este modelo está basado en los resultados obtenidos con la cepa de simio RRV la cual es sensible a neuraminidasa [5] (figura 3). En este modelo se propone que el contacto inicial del virus con la superficie celular es a través de un receptor que tiene ácido siálico, muy probablemente un gangliósido. Esta interacción inicial se da a través del dominio VP8 de VP4. Esta interacción inicial probablemente induce un cambio conformacional en VP4 lo que permite las interacciones subsecuentes con el dominio I de la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través del dominio DGE en VP5. Después de esta segunda interacción, se llevan a cabo otras tres interacciones. Sin embargo, el orden de éstas no ha sido establecido aún. Estas interacciones se presentan entre: i) el dominio KID de VP5 y el dominio de unión a ligando de hsc70, ii) la región CNP de VP7 y la integrina $\alpha v\beta 3$, y iii) el dominio GRP de VP7 y la integrina $\alpha x\beta 2$ [5]. Los contactos iniciales del virus con la superficie celular podrían promover un cambio conformacional en VP4 para facilitar la interacción de VP5 con hsc70 y la interacción de VP7 con las integrinas. Con la excepción del ácido siálico, las moléculas descritas parecen ser usadas por varias cepas de rotavirus para infectar a las células. Sin embargo, se desconoce si estas interacciones son secuenciales o pueden ser usadas alternativamente por diferentes virus para entrar a la célula.

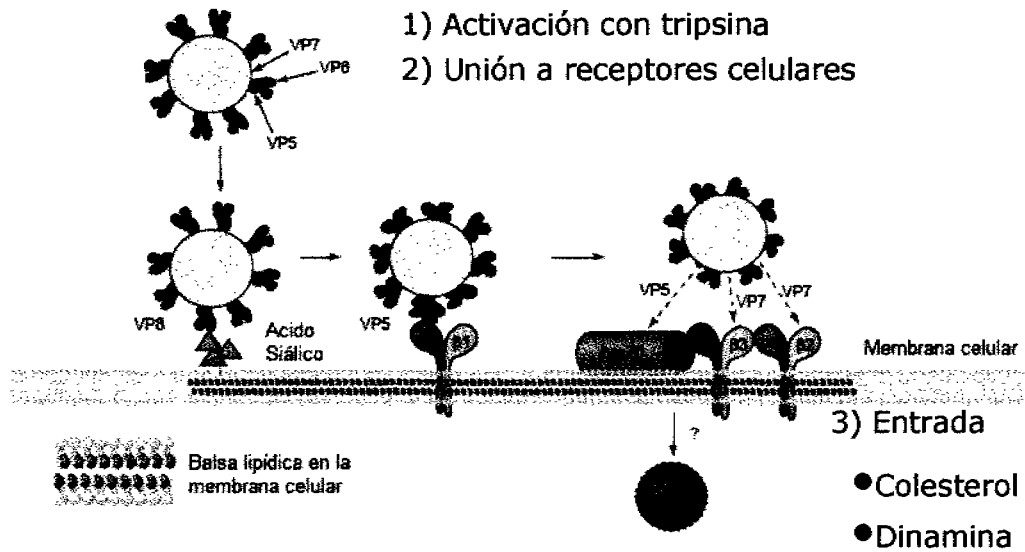


Figura 3. Primeros pasos en la infección de la cepa de rotavirus RRV. Los rotavirus requieren de un procesamiento proteolítico para ser infecciosos. Una vez procesada la proteína VP4, el virus se une específicamente a sus receptores celulares. La unión a los receptores celulares provoca cambios conformacionales en la partícula viral y en la célula que facilitan la entrada del virus [5].

Una vez que el virus ha reconocido a sus receptores en la superficie celular, el siguiente paso es la penetración de la membrana celular. En el caso de rotavirus, aún no se conoce el mecanismo que utiliza para entrar a la célula. Algunos autores han sugerido que el virus puede entrar por penetración directa [2] mientras que estudios de microscopía electrónica han sugerido que el virus pudiera entrar por endocitosis. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos demostrado mediante el uso de drogas y de mutantes dominantes negativas (de las proteínas eps15, caveolina-1 y dinamina-2), que la entrada de la cepa de rotavirus RRV es independiente tanto de la endocitosis mediada por clatrina como la mediada por caveolina y sin embargo, depende de dinamina, una proteína involucrada en la liberación de la vesícula de la membrana plasmática [12].

En conjunto, estos datos sugieren que los rotavirus podrían estar entrando a la célula por una vía aún no caracterizada.

Endocitosis como vía de entrada de virus

La endocitosis es un proceso celular que consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos como son la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis, tanto celular como del organismo completo.

Existen diferentes rutas de endocitosis que son usadas por la célula para llevar a cabo sus funciones celulares [14]. En la figura 4 se representan estas rutas. Sin embargo, dados los avances metodológicos recientes y dada la complejidad del proceso de endocitosis, se siguen encontrando nuevas rutas cuya caracterización esta en proceso. El estudio de las diferentes rutas de endocitosis se ha realizado utilizando varias estrategias (tabla 2). Una de ellas es el uso de drogas que inhiben algún paso de la vía endocítica. Por ejemplo, existen compuestos que inhiben el reclutamiento de proteínas que cubren las vesículas endocíticas, etc. Otra estrategia utilizada son las mutantes dominantes negativas de proteínas clave para que se lleve a cabo la vía. Esta estrategia permite una inhibición más específica que el uso de drogas. Finalmente, el uso de la técnica de RNA de interferencia (RNAi) permite el silenciamiento específico de la proteína de interés.

La endocitosis está constituida por una red de varios organelos los cuales difieren en su composición proteica y propiedades bioquímicas (figura 4). La presencia de las GTPasas de la familia Rab contribuye a la diferenciación entre los distintos tipos de endosomas. Estas GTPasas son importantes en la regulación del tráfico intracelular

porque regulan la fusión de las vesículas a los endosomas. De manera general, la unión del ligando al receptor favorece la formación de la vesícula endocítica. Esta vesícula entrega su carga a los endosomas tempranos (o endosomas de distribución), organelos con un pH alrededor de 6 donde se localizan las Rab GTPasas 4 y 5. En los casos donde la molécula endocitada es un receptor unido a su ligando, el pH ácido puede promover la disociación del ligando de su receptor. Usualmente, el ligando, el cual permanece en la vía, es degradado mientras que el receptor entra a los endosomas de reciclamiento (donde esta localizada Rab11) para regresar a la membrana celular. Las moléculas que son destinadas a su degradación o que requieren llegar al interior celular, cerca del núcleo, entran a los endosomas tardíos (también conocidos como cuerpos multivesiculares -MVBs-). En estos organelos, con un pH menor a 6, se localiza la GTPasa Rab 7. Finalmente, la molécula endocitada llega a los lisosomas donde puede ser degradada por enzimas que están activas en un ambiente ácido. En el transcurso de toda la ruta endocítica, existen posibles rutas de escape para evitar la degradación por los lisosomas (figura 4).

En algunos casos, la endocitosis de las moléculas depende de señales presentes en ellas. Tal es el caso de las proteínas transmembranales las cuales tienen señales presentes en sus dominios citosólicos. Existen dos clases principales de señales, las basadas en tirosina y las basadas en di-leucina. Estas señales son reconocidas por proteínas que están asociadas a la membrana plasmática. Entre ellas se encuentran las proteínas involucradas en la endocitosis mediada por clatrina [15]. Estudios recientes sugieren que la ubiquitina puede representar otra señal de distribución [15].

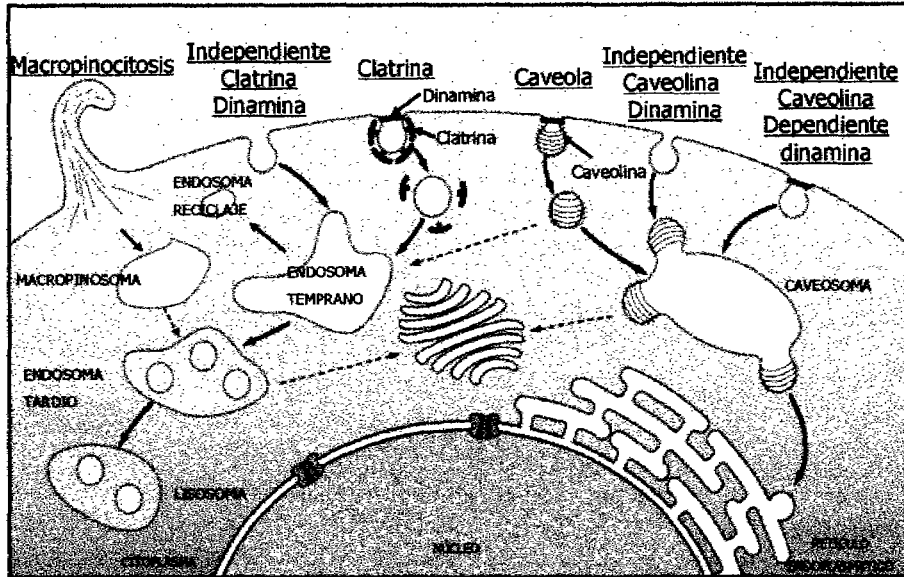


Figura 4. Esquema general de las diferentes rutas de endocitosis. Se muestran las distintas vías de endocitosis y el sitio intracelular al que llegaría una molécula internalizada por cada vía. Modificada de Marsh M & Helenius A [16].

La entrada de un virus por endocitosis le da algunas ventajas. Primero, las partículas virales son internalizadas sólo en aquellas células que realizan un transporte membranal activo. Segundo, evitan la barrera del citoesqueleto de actina cortical. Y por último, los organelos endocíticos proveen ambientes que facilitan la penetración viral.

Tabla 2. Estrategias usadas para el estudio de los distintos componentes y vías de la endocitosis

Vía	Inhibidor	Efecto	Observaciones
Clatrina	Clorpromazina	Inhibe el ensamble de la malla de clatrina	Puede afectar la fluidez y permeabilidad de la membrana [17]
	Medio sin potasio	Polimerización anormal de clatrina. Remueve las vesículas cubiertas de la membrana	Retirar el potasio puede tener otros efectos como la inhibición del transporte de proteínas secretoras [18]
	Medio con sacarosa		
	Mutantes dominantes negativa de eps15	Evita el reclutamiento de AP-2 a la membrana celular, inhibiendo la formación de la malla de clatrina	Pudiera no inhibir aquellas vesículas con cubierta de clatrina que no usen el complejo AP-2 [19]
	siRNAs cadena pesada de clatrina	Inhiben específicamente la expresión de clatrina	
Caveola	Nistatina	Secuestran el colesterol de la membrana	Efecto no es específico [20].
	Filipina		
	Ciclodextrina		
	Mutante dominante negativa de caveolina	Inhibe la asociación de la caveolina a las balsas lipídicas	
	siRNAs caveolina	Inhibe específicamente la expresión de caveolina	
Macropinocitosis	Citocalasina D	Previene la polimerización de actina	Puede inhibir la entrada de moléculas que entran por otras rutas de endocitosis [21]
	Amilorida	Inhibe intercambiadores Na^+/H^+	Inespecífico [22]
	Toxina B de <i>Clostridium difficile</i>	Inhibe Rho GTPasas	Las Rho GTPasas pueden participar en otras vías [23, 24]

Endocitosis mediada por clatrina

Es el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de moléculas a la célula. Este tipo de endocitosis requiere una serie de componentes estructurales para poder formar la vesícula de manera que pueda ser internalizada. Uno de estos componentes y por el cual esta vía recibe su nombre, es la clatrina. La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada “el trisqueleto” (triskelion) de clatrina. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras, es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β_2 , μ_2 y σ_2). El complejo AP-2 interactúa con clatrina, a través de la subunidad β_2 , y estimula su polimerización generando una malla de clatrina que cubre la vesícula [25]. Anteriormente, se pensaba que este complejo era esencial para la formación de la vesícula cubierta de clatrina. Sin embargo, en células donde se silenció la expresión de este complejo se siguieron formando vesículas cubiertas con clatrina lo que sugiere que AP-2 no es esencial [19]. Recientemente, se ha reportado que diferentes moléculas como transferrina (marcador de endocitosis mediada por clatrina) y EGF (factor de crecimiento epidérmico) entran por diferentes poblaciones de vesículas cubiertas con clatrina dado que al silenciar AP-2 sólo se inhibe la internalización de transferrina pero no la de EGF [19]. Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta que se forma la vesícula endocítica. La fisión de la vesícula cubierta con clatrina es controlada por la GTPasa dinamina. Se propone que la dinamina actúa como una mecano-enzima la cual usa la hidrólisis de GTP para generar la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana [26]. Finalmente, la vesícula liberada pierde la cubierta de clatrina por la acción de la chaperona hsc70, la actividad de ATPasa de la proteína hsc70 es estimulada por auxilina. Un factor

adicional que podría contribuir al desensamble de clatrina es la fosfatasa sinaptojanina, esta enzima regula el metabolismo de PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) el cual interactúa con AP-2, entre otras, favoreciendo que el complejo se asocie a la membrana. La acción de la fosfatasa desestabiliza la asociación de AP-2 con la membrana, además de promover el ensamble de la cubierta de clatrina, el complejo AP-2 actúa como una plataforma para proveer sitios de interacción para varias proteínas importantes para la endocitosis dependiente de clatrina, incluyendo Eps15. Ésta última es una proteína ubicua que está asociada de manera constitutiva a AP-2 [27].

La participación del citoesqueleto de actina en la endocitosis mediada por clatrina se ha sugerido por varias observaciones. Entre las que se encuentra la co-localización de clatrina con el complejo Arp2/3 (que promueve polimerización de actina) lo que sugiere que en los sitios donde se forman las vesículas de clatrina se requiere de la polimerización de actina para, tal vez, favorecer la internalización de la vesícula endocítica [28]. La GTPasa dinamina también interactúa con proteínas que se asocian con los filamentos de actina como son cortactina, abp1, intersectina y sindapina estableciendo un puente entre la endocitosis y el citoesqueleto de actina [29].

En general, las moléculas –incluidos los virus- que entran a la célula por endocitosis mediada por clatrina son expuestas al ambiente ácido de los endosomas y pueden responder al bajo pH sufriendo cambios conformacionales. En el caso de los virus, estos cambios conformacionales permiten la exposición de péptidos de fusión que permiten su liberación al citosol. Dependiendo del requerimiento de pH, el sitio de penetración de los virus puede ser los endosomas tempranos (pH 6.5 a 6.0), tardíos (pH 6.0 a 5.5) e inclusive los lisosomas (pH 5.5 a 4). Un ejemplo de un virus que sufre una

fusión de membrana catalizada por un ambiente ácido es el virus de Influenza. En la superficie celular, el virus se une a receptores que tienen ácido siálico a través de las cabezas globulares de la glicoproteína viral hemaglutinina (HA). Cuando el virus es internalizado vía endocitosis mediada por clatrina el bajo pH de los endosomas tardíos (alrededor de 5) provoca cambios conformacionales en las cabezas globulares de la proteína HA lo que expone el péptido de fusión. Estos cambios además, acercan el péptido de fusión a la membrana celular con lo cual la fusión de la membrana viral con la celular se puede llevar a cabo y el virus es liberado al citoplasma. Si estos cambios conformacionales se inducen antes de que el virus sea internalizado mediante un tratamiento a pH ácido, el virus se inactiva y pierde su infectividad [30].

Por otro lado, en algunos casos el pH ácido no es suficiente para inducir/exponer la fusión de la partícula viral con el endosoma. Se ha reportado que algunos virus son activados a través de cortes proteolíticos que son llevados a cabo por proteasas endosomales, como las catépsinas (que son proteasas cuya actividad depende de pH). En este caso el pH endosomal es necesario para activar a la proteasa endosomal que al cortar alguna proteína viral promueve el cambio conformacional de la partícula viral lo que favorece a su vez la penetración al citoplasma celular [31].

Se ha demostrado que varios virus utilizan esta vía para entrar a la célula. Entre ellos están virus envueltos como el virus de Influenza, Semliki forest, el virus del Nilo, el virus Hanta y el virus de estomatitis vesicular (VSV) [32-35]. Virus no envueltos como papilomavirus también entran por esta vía [36].

Endocitosis mediada por caveolas

Las caveolinas son el principal componente de las caveolas. Las caveolinas son proteínas integrales de membrana que están asociadas a microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos también llamados balsas lipídicas. La formación de la caveola depende de la expresión de caveolina-1 en células no musculares y de caveolina-3 en células de músculo [37]. Las vesículas internalizadas por esta vía son liberadas, a través de la acción de dinamina, a estructuras llamadas caveosomas presentes en el interior de la célula. La ausencia de marcadores para endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje indica que estas estructuras representan un nuevo tipo de organelos [38]. A diferencia de los endosomas, estos organelos tienen pH neutro. Algunos reportes sugieren que el papel de la caveolina es el de disminuir la endocitosis al estabilizar las balsas lipídicas [39].

Existen varios virus que pueden entrar por esta vía como son el virus de la leucemia murina, ecovirus y SV40, entre otros [40-42]. En el caso de SV40, la infectividad de este virus se ve disminuida cuando se trata a las células con drogas que inhiben esta vía como la nistatina [40]. Asimismo, la expresión de una mutante dominante negativa de dinamina (defectuosa en su actividad de GTPasa) inhibe la entrada de este virus [43] lo que sugiere que SV40 entra a la célula por una vía dependiente de caveolina y dinamina.

Endocitosis independiente de clatrina y de dinamina

En general, las proteínas ancladas a glicosil-inositol-fosfato (GPI) entran a la célula por esta vía y son dirigidas a compartimentos endosomales tempranos

enriquecidos en proteínas ancladas a GPI, GEECs (GPI-AP enriched early endosomal compartments) [23]. Los GEECs son compartimentos endosomales distintos que no colocalizan con caveolina. La inhibición de la endocitosis mediada por clatrina, y el uso de mutantes de dinamina, no inhiben la internalización de estas proteínas. La expresión de una dominante negativa de la GTPasa cdc42 sí inhibe esta vía [23]. Recientemente se ha descrito que el virus de poliomavirus murino entra a las células por una vía similar [44]. Este es un virus no envuelto con genoma de DNA que transforma eficientemente células en cultivo e induce tumores en una gran variedad de tejidos en el ratón. El virus puede infectar varios tipos celulares, en parte, porque se une a glicoproteínas con ácido siálico las cuales son expresadas de manera abundante en el ratón. Para determinar la entrada de este virus se evaluó el efecto de inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina y caveola en su infectividad. Se demostró mediante tratamientos con drogas (sacarosa y clorpromazina) y de la dominante negativa de dinamina que este virus entra a las células de manera independiente de clatrina, dinamina y caveolina [44]. Este resultado fue confirmado por microscopia de fluorescencia ya que el virus no co-localiza con clatrina o caveolina. Falta por determinar si cdc42 juega algún papel en la entrada de este virus.

Endocitosis independiente de clatrina pero dependiente de dinamina

Esta vía está definida por su independencia a clatrina y caveolina, su dependencia a dinamina y a la presencia de colesterol en la membrana. Dicha vía es utilizada en la internalización del receptor de IL-2 la cual, además, está regulada por la GTPasa RhoA [24]. La endocitosis del receptor de citocinas γ_c , que requiere de la

polimerización de actina, también es llevada a cabo de esta manera [45]. Por el momento no se conoce más sobre esta vía.

Como se mencionó anteriormente, rotavirus entra a la célula por una vía similar [12]. Sin embargo, desconocemos si la GTPasa RhoA (o alguna otra) tiene algún papel en la entrada de este virus.

Macropinocitosis

Esta vía involucra la internalización de grandes áreas de fluido y membrana plasmática. La macropinocitosis ocurre cuando protuberancias de la membrana plasmática se fusionan para generar vesículas grandes ($>1\mu\text{m}$) llamadas macropinosomas. Parte fundamental de este proceso es la formación de ruffles de actina los cuales están regulados por la GTPasa Rac1.

Un virus que entra a la célula utilizando la vía de la macropinocitosis es el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Este virus infecta células del sistema inmune que expresan las moléculas de superficie CD4, CCR5 y CXCR4. Recientemente, se ha demostrado que este virus entra a los macrófagos, un tipo de célula del sistema inmune, por esta vía. Esta observación se sustenta en la presencia del virus detectada por microscopía electrónica en macropinosomas y la inhibición de su entrada por drogas que evitan la formación de ruffles (extensiones de membrana generadas por la remodelación del citoesqueleto de actina), tales como amilorida [46].

II. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la entrada de la cepa de rotavirus de simio RRV a la línea celular MA104 no depende de la endocitosis mediada por clatrina ni de la mediada por caveolina-1, pero sí depende de la presencia de colesterol en la membrana y de la actividad de dinamina [12]. Esto mediante el uso de mutantes dominantes negativas y drogas que afectan distintas vías de entrada. Asimismo, se ha propuesto que la entrada de RRV a la célula no depende de actina dado a que el tratamiento de células MA104 con citocalasina D que es una droga que inhibe la polimerización de actina, no tiene efecto sobre la infectividad de esta cepa [47]. Por otro lado, resultados preliminares sugieren que la vía de entrada de la cepa de rotavirus humana Wa es diferente, ya que el tratamiento de las células con drogas que inhiben la acidificación de los endosomas como bafilomicina y cloruro de amonio disminuye la infectividad de este virus, mientras que la infectividad de la cepa de simio RRV no se ve afectada. Los resultados anteriores sugieren que distintas cepas de rotavirus podrían tener en principio diferentes vías de entrada a la célula. Una de estas vías, la cual es dependiente de la acidificación endosomal ya que se afecta por bafilomicina y cloruro de amonio, podría estar siendo utilizada por la cepa Wa; y la segunda vía, la cual depende de colesterol y dinamina pero no de clatrina ni de caveolina, estaría siendo utilizada por la cepa RRV.

III. HIPÓTESIS

Es posible que distintas cepas de rotavirus que tienen diferentes requerimientos de moléculas de superficie para unirse a la célula huésped, utilicen vías de entrada alternativas para infectar la misma línea celular.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la vía de entrada de la cepa de rotavirus humana Wa y compararla con otras cepas de rotavirus

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar el papel del pH en la entrada de las diferentes cepas de rotavirus
- ❖ Determinar el papel de clatrina y dinamina en la entrada de las diferentes cepas de rotavirus

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Células y Virus. La línea celular de epitelio de riñón de mono rhesus MA104 fue crecida en medio mínimo esencial de Eagle (MEM-Advanced, Gibco) suplementado con 3% de suero bovino fetal. Los rotavirus de simio rhesus RRV y de humano Wa fueron obtenidos de H.B. Greenberg (Universidad de Stanford en Stanford, California). La cepa porcina TFR fue obtenida de I. Holmes (Melbourne, Australia) y la cepa bovina UK fue obtenida de D.R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, UK). El reovirus tipo 1 fue obtenido de C. Ramos (Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos).

Anticuerpos y reactivos. Se utilizaron tres anticuerpos policlonales contra rotavirus. Dos contra la partícula viral completa (α -TLPs de conejo y un antisuero de cabra); y otro dirigido contra una proteína viral llamada NSP2 que fue producido en conejo. Los tres anticuerpos fueron producidos en el laboratorio. Por otro lado, el anticuerpo policlonal de conejo contra reovirus también fue producido en el laboratorio. El anticuerpo monoclonal anti-HA fue comprado a Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Las drogas bafilomicina A1 y el inhibidor de catepsina B (CA-074) fueron compradas a Sigma (St. Louis, Mo.). El inhibidor de la catepsina L (Z-FF-FMK) fue comprado a Calbiochem (La Joya, CA). El cloruro de amonio fue comprado a J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 y 568 fueron comprados a Molecular Probes (Eugene, Oreg.).

Ensayos de Infectividad. Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 96 pozos fueron pre-tratadas a 37°C con bafilomicina (1 hora), los inhibidores de las

catepsinas B y L (1 hora), con cloruro de amonio (por 30 minutos) o con sacarosa (por 10 minutos) a las concentraciones indicadas en cada ensayo. Después del tratamiento correspondiente, las células fueron infectadas con 200 unidades formadoras de focos (FFUs) por pozo de reovirus y de las cepas de rotavirus (Wa, UK, TFR y RRV) y en presencia del tratamiento correspondiente durante 1 hora a 37°C. Después de este periodo, el inóculo viral fue retirado. El virus que no fue internalizado durante este tiempo, se desprendió de la superficie celular utilizando EGTA 3mM por 2 minutos y la infección se dejó proceder por 15 horas. En el caso de reovirus, éste fue neutralizado con un anticuerpo policlonal (1:500) que fue incubado durante 15 minutos después del período de adsorción. Quince horas post-infección, las células fueron fijadas y procesadas en un ensayo de detección de focos con inmunoperoxidasa usando anticuerpos policlonales. Brevemente, las células fueron fijadas y permeabilizadas con acetona al 80% en PBS por 15 minutos. Después de ese lapso, fueron lavadas con PBS tres veces y fueron incubadas con un anticuerpo anti-Rotavirus (anti-TLPs) diluido 1:2000 (en el caso de las cepas RRV, UK y TFR), mientras que las células infectadas con la cepa Wa fueron incubadas con un anticuerpo anti-Wa diluido 1:1000 por 1 hora a 37°C. En el caso de las células infectadas con reovirus, éstas fueron incubadas con un anticuerpo anti-reovirus diluido 1:2500. Después de este periodo, las células fueron lavadas con PBS tres veces e incubadas con proteína A acoplada a peroxidasa (1:3000) por 1 hora a 37°C. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente con PBS tres veces y se adicionó el sustrato de la peroxidasa (carbazol y peróxido de hidrógeno), hasta ver el desarrollo de color. Se lavó con agua para detener la reacción [48]. Las unidades formadoras de focos (FFU) fueron contadas en un microscopio Invertido Nikon Diaphot 300 automático provisto de una cámara COHU color CCD y software Visiolab 1000.

Ensayos de transfección. Las células crecidas en cubreobjetos de 10mm de diámetro a un 70% de confluencia, fueron transfectadas con diferentes plasmidos usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) de acuerdo al protocolo del proveedor. Generalmente, las células fueron transfectadas 48 horas antes de la infección viral. Los plasmidos usados fueron los siguientes: la construcción pE Δ 95/295 (Eps15 mutante), la cual codifica una mutante de Eps15 que carece del segundo y tercer dominio EH y funciona como dominante negativa (DN), y el plasmido control pD3 Δ 2 (Eps15 control) que expresa una versión truncada de Eps15 que funciona como la proteína silvestre [49]. Estos plasmidos fueron amablemente donados por A. Benmerah (INSERM, Paris, Francia). Ambas construcciones están fusionadas con GFP en su N-terminal. Los plasmidos pCDNA3.1/Dyn2 (Dinamina *wt*), el cual expresa la dinamina 2 fusionada en su amino terminal con hemaglutinina (HA) y la dominante negativa pCDNA3.1/K44A (Dinamina mutante), el cual codifica la dinamina 2 K44A también fusionada en su amino terminal con HA fueron amablemente donados por S.L. Schmid (Scripps Research Institute, La Jolla, California). La expresión de dinamina y su dominante negativa fueron monitoreados usando un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta HA.

Inmunofluorescencia. Las células MA104 crecidas en cubreobjetos de 10mm de diámetro a un 70% de confluencia y transfectadas 48 horas antes, fueron infectadas con las diferentes cepas de rotavirus a una multiplicidad de infección (moi) de 10. El reovirus tipo 1 se utilizó como control y se utilizó también a una moi de 10. Los diferentes virus fueron adsorbidos por 2 horas y después de este tiempo, el inoculo viral fue retirado y se agregó MEM sin suero. La infección se dejó proceder por 8 horas. Después de este tiempo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS

por 20 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente fueron lavadas 4 veces por 5 minutos con 50mM NH₄Cl en PBS. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con Tritón 0.5% en buffer de bloqueo (BSA 1%, 50mM NH₄Cl en PBS) por 15 minutos a TA, después de 4 lavados de 5 minutos con 50mM NH₄Cl en PBS, las células fueron incubadas con los anticuerpos indicados en cada figura por 1 hora a TA. Pasado este lapso, las células fueron lavadas nuevamente e incubadas con los anticuerpos secundarios indicados en cada figura por 1 hora a TA. Después de esta incubación, las células fueron lavadas 4 veces por 5 minutos con PBS con 50mM NH₄Cl y finalmente, las células fueron montadas en fluoprep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop 2 mot plus) acoplado a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ). Las imágenes fueron capturadas digitalmente y preparadas en Adobe Photoshop 5.0.

Incubación de virus a diferentes pHs. Los virus fueron pre-incubados en MEM a diferentes pHs por 30 minutos a 37°C. Para estabilizar el pH del MEM, se le agregó 10mM HEPES. El pH del MEM fue ajustado con buffer de ácido cítrico (15mM ácido cítrico más 150mM NaCl). Después de la incubación una parte del virus fue neutralizado con HEPES 25mM pH 7.4. Las células fueron infectadas con el virus por una hora a 37°C. La infección se dejó proceder por 15 horas y posteriormente, se detectaron las células infectadas como se indica en el ensayo de infectividad.

Ensayos de unión. Las células crecidas en cajas de 48 pozos fueron lavadas una vez e incubadas con MEM sin suero por 30 minutos a 37°C. Después de este tiempo, se retiró el MEM y se agregaron 500µl de una solución de albúmina bovina al 1% en PBS. Se

dejó por 1 hora a TA. Posteriormente, las células fueron lavadas con una solución fría de albúmina bovina al 0.5% en PBS e incubadas con distintas concentraciones de sacarosa fría por 10 minutos. Se retiró la solución y se agregó la cantidad indicada de virus (semipurificado a través de un colchón de sacarosa) diluida en MEM frío con la cantidad correspondiente de sacarosa, por 1 hora a 4°C. Después de este tiempo, las células fueron lavadas tres veces con una solución fría de albúmina bovina al 0.5% en PBS y finalmente, fue agregado 120µl de buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100). Las células fueron congeladas y descongeladas dos veces, y la cantidad de virus presente fue determinada por un ensayo de ELISA. Como control se hizo un ensayo de unión en las mismas condiciones diluyendo el virus en MEM y omitiendo las incubaciones con sacarosa.

ELISA. Para detectar el virus obtenido en los ensayos de unión se realizó un ELISA en las siguientes condiciones: para la captura del virus, las placas de ELISA fueron incubadas con un antisuero de cabra para rotavirus (diluido 1:5000). Posteriormente, las placas fueron bloqueadas con BSA al 1% en PBS, el virus obtenido de los ensayos de unión fue incubado y para su detección las placas fueron incubadas con un antisuero de conejo para rotavirus (α -TLPs, diluido 1:1000). Posteriormente, se utilizó un anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (diluida 1:1500). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C por 1 hora y entre cada tiempo de incubación, las placas fueron lavadas 3 veces con BSA al 0.1% en PBS. Finalmente, se adicionó el sustrato de la fosfatasa alcalina diluido en buffer de dietanolamina (1% dietanolamina, 1mM MgCl₂, 5mM azida de sodio, pH 9). Las placas se incubaron a 37°C hasta ver coloración y la absorbancia a 405nm fue leída en un Lector de placas (Bio-Tek Instruments). Como control de que los anticuerpos usados en el ensayo de ELISA reconocieran a las

diferentes cepas de rotavirus, se detectaron diferentes diluciones del virus utilizado en el ensayo de unión.

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

VII. RESULTADOS

1. Dependencia de pH

a. Compuestos que evitan la acidificación de los endosomas

Para determinar si la vía de entrada utilizada por las cepas utilizadas en este trabajo es dependiente de pH, tratamos a las células con bafilomicina o con cloruro de amonio. Estos tratamientos evitan la acidificación de los endosomas a través de diferentes mecanismos. La bafilomicina inhibe la ATPasa vacuolar presente en los endosomas con lo cual evita la entrada de los protones al organelo y por lo tanto previene su acidificación, mientras que el cloruro de amonio alcaliniza los endosomas al secuestrar los protones presentes en estas estructuras membranosas.

Dado que existen diferentes cepas de rotavirus con distintos requerimientos por receptores celulares, decidimos evaluar si estas diferencias marcaban una preferencia por la vía de entrada. En este trabajo utilizamos además de la cepa humana Wa, las cepas RRV (simio), UK (bovina) y TFR (porcina). En la tabla 1 se muestran los distintos receptores que usa cada cepa de rotavirus. Se puede clasificar a las distintas cepas por su dependencia por un receptor sialidado (resistentes o sensibles a neuraminidasa, enzima que rasura los ácidos siálicos) y/o por el uso de las distintas integrinas celulares.

En estos ensayos, las células fueron pre-tratadas con las drogas por los tiempos indicados en el pie de figura y posteriormente fueron infectadas con las

diferentes cepas de rotavirus durante 1 hora a 37°C, manteniendo la droga durante este tiempo. El virus que quedó unido a la superficie celular y no entró durante este tiempo, fue desprendido mediante un tratamiento con EGTA 3mM por 2 minutos. Este tratamiento disocia las proteínas de la capa externa de rotavirus y por lo tanto el virus se desprende de la célula. A las 15 horas post-infección (hpi) se cuantificaron el número de células infectadas. Como control positivo se utilizó reovirus, miembro de la misma familia de rotavirus *Reoviridae*, cuya infectividad es disminuida con ambos tratamientos [50, 51]. En este caso, las partículas de reovirus que quedaron unidas a la superficie celular fueron neutralizadas con un anticuerpo anti-reovirus.

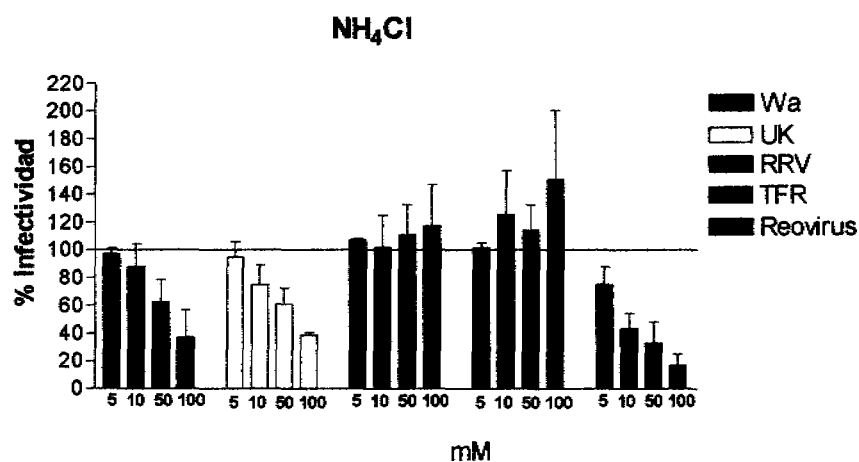


Figura 5. Efecto del tratamiento con cloruro de amonio sobre la infectividad de distintas cepas de rotavirus. Las células fueron pre-incubadas por treinta minutos con cloruro de amonio a las concentraciones indicadas. Posteriormente, se agregó el virus, también en presencia del reactivo. A las 15hpi, las células se fijaron y tiñeron para detectar las células infectadas (ver materiales y métodos). Las barras muestran la infectividad con respecto al control no tratado con cloruro de amonio que se tomó como 100% de infectividad (indicado con una línea sólida). Se muestra la desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes.

Cuando las células fueron tratadas con cloruro de amonio, se observó una disminución en la infectividad tanto de la cepa humana Wa, como de la cepa bovina UK, que resultó estadísticamente significativa (figura 5). Estos resultados

sugieren que la entrada de las cepas Wa y UK ambas resistentes a neuraminidasa (tabla 1), podría depender de la acidificación de los endosomas. En cambio, la infectividad no se vio afectada en las cepas RRV y TFR ambas sensibles a neuraminidasa (tabla 1). La infectividad de reovirus que se utilizó como control positivo, se vio claramente afectada por este tratamiento (fig. 5).

Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con bafilomicina, se observó, al igual que con el tratamiento con cloruro de amonio, que la infectividad de la cepa Wa disminuyó y ésta fue dependiente de la dosis y estadísticamente significativa (figura 6). Con respecto a la otra cepa resistente a neuraminidasa, UK, se observó una disminución en la infectividad menor que con el tratamiento con cloruro de amonio. La infectividad de las cepas sensibles a neuraminidasa, RRV y TFR, se vio afectada por el tratamiento con esta droga (figura 6).

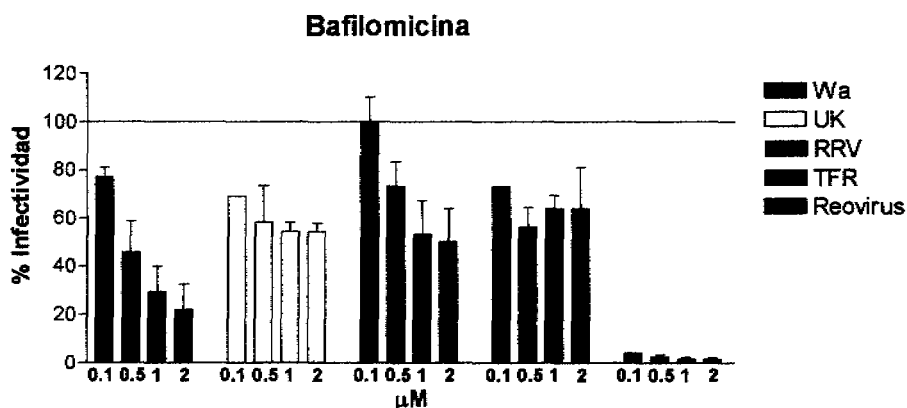


Figura 6. Efecto del tratamiento con bafilomicina sobre la infectividad de distintas cepas de rotavirus. Las células fueron pre-incubadas por una hora con bafilomicina a las concentraciones indicadas. Posteriormente, se agregó el virus en presencia de la droga. A las 15hpi, las células se fijaron y tiñeron para detectar las células infectadas (ver materiales y métodos). Las barras muestran la infectividad con respecto al control no tratado con bafilomicina que se tomó como 100% de infectividad (indicado con una línea sólida). Se muestra la desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes.

Tomados en conjunto, los resultados anteriores sugieren que la entrada de la cepa Wa, resistente a neuraminidasa, es dependiente de pH ácido, lo cual implicaría que transita por la vía endocítica. Con respecto a la otra cepa resistente a neuraminidasa, UK, su entrada pareciera ser dependiente de pH. Por otro lado, la entrada de las cepas sensibles a neuraminidasa, RRV y TFR, aparentemente no depende de pH.

b. Pre-incubación en pH ácido

El pH ácido se ha asociado a cambios conformacionales de la partícula viral que facilitan la penetración del virus a la célula. Existen algunos ejemplos de virus en los que se ha observado que si se pre-incuba al virus en pH ácido éste pierde su infectividad [30]. Esto sugiere que el tratamiento con pH ácido provoca cambios conformacionales en la partícula viral que evitan su interacción con sus receptores celulares y la entrada a la célula. Sin embargo, también existen reportes donde se ha visto que la dependencia del pH está dada no por el cambio de pH *per se*, sino por requerir un corte proteolítico realizado por las proteasas presentes en los endosomas [31, 52, 53]. La actividad de estas proteasas (como las catepsinas) depende del pH ácido del endosoma y al evitar su acidificación se inhibe su actividad. Para estudiar si la dependencia de pH de la cepa Wa y UK es debida a la activación de catepsinas endosomales, o al cambio de pH *per se* realizamos el siguiente experimento: pre-incubamos al virus a diferentes pH; en caso de que el pH provocara cambios en la partícula, decidimos evaluar si el efecto de éste era reversible y para eso parte del virus tratado fue neutralizado con HEPES a pH 7.4. La infectividad de los virus así tratados fue cuantificada.

Como se puede apreciar en la figura 7, la infectividad de ninguna de las cepas de rotavirus ni de reovirus se vio afectada a pH 5 y 6, estos pH son los de los endosomas tempranos o tardíos. Sin embargo, la infectividad de todas las cepas se vio muy afectada a pH muy ácidos. Dicho efecto no es reversible dado que al neutralizar el pH no se recuperó la infectividad. Estos resultados sugieren que la dependencia de pH de las cepas resistentes a neuraminidasa, Wa y UK, no parece estar dada por el pH *per se*.

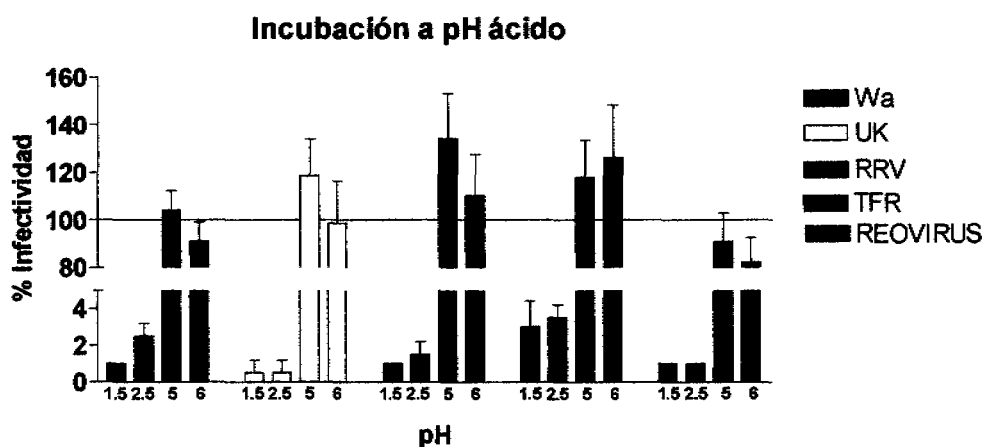


Figura 7. Efecto del tratamiento a diferentes pH sobre la infectividad viral. Los virus fueron pre-incubados en MEM a los diferentes pH indicados en la figura por treinta minutos a 37°C. Acto seguido, parte del virus fue neutralizado con HEPES 25mM a pH 7.4 y la otra parte se mantuvo al mismo pH. Los virus así tratados fueron adsorbidos por una hora a 37°C sobre monocapas de células MA104 y después de retirar el inóculo la infección se dejó proceder durante 15 horas, tiempo al que las células se fijaron e inmunotifieron. Los datos se grafican como porcentaje de infectividad considerando como 100% la infectividad de cada virus a pH 7.4 (indicado con una línea sólida).

c. Papel de las catepsinas

Continuando con la caracterización del papel del pH ácido en la entrada de rotavirus, decidimos evaluar el papel de las catepsinas. Existen varios reportes donde se ha encontrado que la dependencia del pH en algunos virus se

debe más bien al requerimiento de un corte proteolítico por enzimas presentes en los endosomas cuya actividad depende de pH [31, 52, 53]. Para determinar si la dependencia de Wa y de UK por el pH se debe más bien al requerimiento de un corte por catepsinas (enzimas proteolíticas endosomales), evaluamos el papel de estas proteasas en la entrada del virus, utilizando inhibidores específicos y caracterizando su efecto sobre la infectividad viral. Las proteasas evaluadas fueron las catepsinas B y L que son residentes característicos de los endosomas y cuya actividad depende de pH ácido.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos cuando se inhibieron las catepsinas B y la L. Estos ensayos fueron realizados de manera similar a los tratamientos con cloruro de amonio y bafilomicina. Los detalles del ensayo se indican en el pie de la figura 8. Cuando se inhibió a la catepsina L, la infectividad de todas las cepas de rotavirus disminuyó ligeramente. Se observó una disminución clara en la infectividad de reovirus, lo cual había sido reportado previamente [52] y nos indica la funcionalidad de este inhibidor. Sobre el efecto de la inhibición de la catepsina B, la infectividad de las cepas de rotavirus no se vio afectada. Sin embargo, el efecto que tuvo este inhibidor sobre la infectividad de reovirus no fue claro por lo que no es posible obtener conclusiones ya que es posible que este inhibidor no haya funcionado adecuadamente.

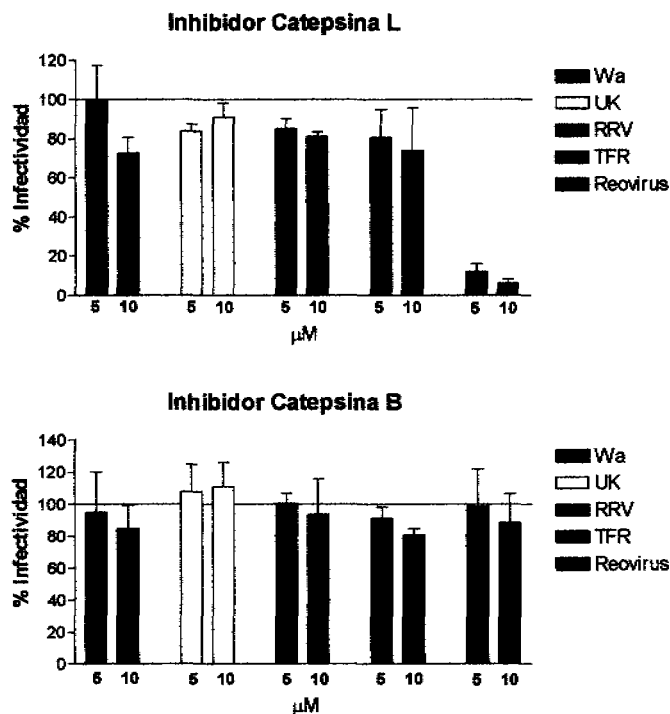


Figura 8. Efecto de la inhibición de las catepsinas B y L en la infectividad de rotavirus. Las células fueron pre-incubadas por una hora con los inhibidores de las catepsinas B y L a las concentraciones indicadas. Posteriormente, se agregó el virus en presencia del respectivo inhibidor. Se muestra el porcentaje de infectividad con respecto a las células que no fueron tratadas con el inhibidor que se tomó como 100% de infectividad (indicado con una línea sólida) y la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

2. Papel de la endocitosis mediada por clatrina

a. Tratamientos con sacarosa

Dado que aparentemente los tratamientos con las drogas que afectan pH sugieren que la entrada de las cepas resistentes a neuraminidasa, Wa y UK, podría depender de pH, decidimos evaluar si este virus estaba entrando por una vía dependiente de clatrina. Como un primer acercamiento, realizamos tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa que inhibe la

endocitosis mediada por clatrina al promover la polimerización anormal de clatrina [54, 55].

En estos ensayos, las células fueron pre-tratadas con diferentes concentraciones de sacarosa por los tiempos indicados en el pie de figura y posteriormente, fueron infectadas con las diferentes cepas de rotavirus durante 1 hora a 37°C manteniendo la misma concentración de sacarosa durante este tiempo. El virus que quedó unido a la superficie celular y no entró durante el tiempo de adsorción, fue desprendido mediante un tratamiento con EGTA 3mM por 2 minutos. Las células infectadas se cuantificaron a las 15 horas post-infección. Como control positivo se utilizó reovirus (en este caso, el virus que quedó unido a la superficie celular fue neutralizado con un anticuerpo específico contra reovirus).

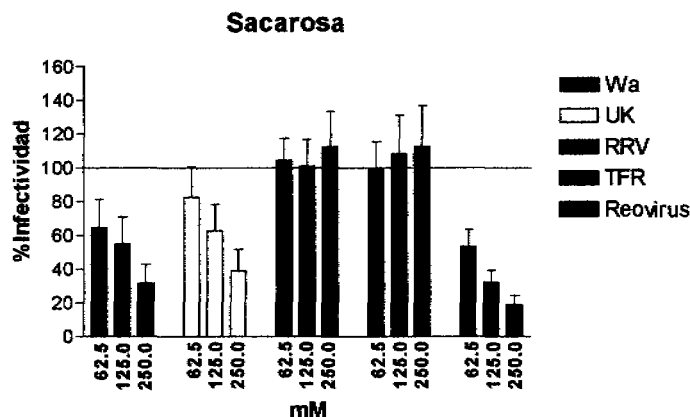


Figura 9. Efecto del tratamiento con sacarosa sobre la infectividad de rotavirus. Las células fueron pre-incubadas por diez minutos con sacarosa a las concentraciones indicadas. Posteriormente, se agregó el virus manteniendo la concentración respectiva de sacarosa que se tomó como 100% de infectividad (indicado con una línea sólida). Se muestra la desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes.

Como se puede apreciar en la figura 9, la infectividad de las cepas resistentes a neuraminidasa, Wa y UK, disminuyó de manera dependiente de la cantidad de sacarosa utilizada, mientras que la infectividad de las cepas sensibles a neuraminidasa, RRV y TFR, no se vio afectada en ninguna de las concentraciones de sacarosa que se probaron.

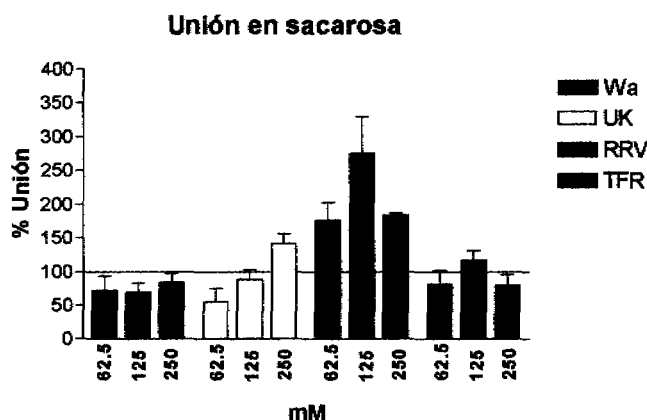


Figura 10. Unión de las cepas de Rotavirus en presencia de sacarosa. Las células fueron pre-incubadas por diez minutos con sacarosa fría a las concentraciones indicadas. Posteriormente, se agregó el virus en presencia del reactivo. Se dejó incubando por una hora u hora y media a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas y lisadas con buffer de lisis para determinar la cantidad de virus unido a la célula mediante un ensayo de ELISA. Las barras muestran la infectividad con respecto al control no tratado con sacarosa que se tomó como 100% de infectividad (indicado con una línea sólida). Se muestra la desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas estudiadas, ya sea las cepas sensibles al tratamiento con sacarosa, Wa y UK (resistentes a neuraminidasa), o/y las cepas TFR y RRV (sensibles a neuraminidasa), que no se ven afectadas por el tratamiento con sacarosa, se unen a la superficie celular de manera muy similar en ausencia o presencia de sacarosa (figura 10). El aumento en la unión de la cepa RRV podría ser explicado por la naturaleza de la progenie viral, la cual genera más partículas físicas que infecciosas [56]. Es muy probable que las partículas físicas sean las que se están uniendo más a la célula

en presencia de la sacarosa pero a pesar de esto, las partículas infecciosas de rotavirus sigan entrando a la célula cuando se mantiene el reactivo (ver figura 9). Estos resultados indican que el efecto obtenido en los ensayos de infectividad con sacarosa para las cepas resistentes a neuraminidasa, Wa y UK, se deben principalmente, a la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina. Las cepas sensibles a neuraminidasa, RRV y TFR, no se vieron afectadas en ningún caso, lo que sugiere que entran a la célula por una vía independiente de la endocitosis mediada por clatrina.

b. Dominantes negativas de eps15 y dinamina

Dado que los tratamientos con sacarosa sugieren que las cepas Wa y UK, pudieran entrar por la vía de endocitosis mediada por clatrina decidimos evaluar el papel de esta ruta utilizando mutantes dominantes negativas que afectan esta ruta endocítica. Para esto, usamos dos construcciones, una que codifica una forma truncada, pero funcional de la proteína Eps15, la cual es necesaria específicamente para la endocitosis dependiente de clatrina y que utilizamos como control (Eps15 control), y otra que expresa una mutante de Eps15 que carece de los dominios EH que son necesarios para la localización de Eps15 a las cubiertas de clatrina (Eps15 mutante). Esta dominante negativa inhibe la endocitosis dependiente de clatrina dado que evita el ensamble de clatrina [49]. Ambas construcciones están fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP) lo que permite su seguimiento.

Por otro lado, también evaluamos el papel de la GTPasa dinamina que está involucrada en la liberación de la vesícula de la membrana plasmática. En

este caso, las células fueron transfectadas con un vector que expresa la proteína silvestre de dinamina (Dinamina *wt*), o con un vector que expresa una mutante de dinamina que no puede unir, ni hidrolizar GTP (Dinamina mutante). En este caso, estas construcciones de dinamina están fusionadas a un epítopo de la hemaglutinina de influenza (HA) y su expresión fue detectada mediante un anticuerpo dirigido contra este péptido.

Anteriormente, ya se había reportado que la entrada de la cepa de simio RRV no depende de Eps15, pero sí de dinamina [12] por lo cual utilizamos esta cepa como control negativo. Como control positivo que mostrara que las proteínas se expresan y fueran funcionales, se utilizó reovirus cuya entrada depende tanto de Eps15, como de dinamina.

En estos ensayos, se cuantificó el número de células que expresaban la proteína correspondiente y de éstas, el número que estaban infectadas con los diferentes virus. Los resultados obtenidos (incluido el número de células contadas) para cada proteína y para cada cepa están resumidos en la tabla 3. En los anexos 1 y 2 se muestran fotografías representativas de los experimentos realizados transfectando a las células con las dominantes negativas de *eps15* y dinamina e infectándolas con los diferentes virus.

Tabla 3. Efecto de las mutantes dominantes negativas de Eps15 y dinamina en la infectividad de las diferentes cepas de rotavirus y reovirus

Virus	Eps15 control	Eps15 mutante	Dinamina wt	Dinamina mutante
Wa	93% (458/493)	78% (220/283)	86% (294/343)	17% (76/452)
UK	91% (409/451)	61% (249/405)	81% (115/142)	17% (60/363)
TFR	97% (400/413)	86% (282/329)	90% (196/218)	24% (76/311)
RRV	96% (400/416)	95% (212/223)	94% (178/189)	42% (184/438)
Reovirus	73% (218/299)	41% (90/217)	78% (104/133)	25% (146/575)

Los resultados se expresan como porcentaje de las células que expresan la proteína y están infectadas con los diferentes virus. Debajo del porcentaje se anotan el número de células infectadas versus el número de células que expresan la proteína. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

En la gráfica 11 se muestran los resultados obtenidos cuando las células fueron transfectadas con la proteína eps15 control (control) o con la mutante dominante negativa de eps15 (mutante). Para la cepa Wa, resistente a neuraminidasa, se encontró que las células que expresaban la mutante de eps15 se infectaron ligeramente menos aunque esta disminución no es estadísticamente significativa. En el caso de la cepa UK, también resistente a neuraminidasa, se obtuvo una disminución en la infectividad estadísticamente significativa (61%, indicado con un asterisco en la gráfica) cuando las células fueron transfectadas con la mutante. La infectividad de las cepas sensibles a neuraminidasa TFR y RRV (control negativo) no se afectó de manera significativa en las células que expresaban la mutante dominante negativa de eps15 (figura 11). Para el control positivo, reovirus, se obtuvo una disminución en la infectividad estadísticamente significativa (25%, indicado con un asterisco en la gráfica) en las células que

expresaban la mutante de eps15 (figura 11). Los resultados obtenidos con los controles van de acuerdo a lo que se sabe de sus respectivas vías de entrada con lo cual podemos decir que el sistema de transfección con la dominante negativa de eps15 es funcional.

Los resultados anteriores sugieren que la entrada de la cepa TFR, sensible a neuraminidasa, al igual que la de RRV, no dependen de la endocitosis mediada por clatrina mientras que la de UK, resistente a neuraminidasa, parece depender de esta vía. En el caso de Wa los resultados obtenidos con la dominante negativa de eps15 difieren de los resultados obtenidos con los tratamientos con sacarosa y sugieren que podría no depender de la vía de entrada mediada por clatrina.

La participación de la proteína dinamina también fue evaluada en este trabajo. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos cuando las células fueron transfectadas tanto con la proteína silvestre de dinamina (control) como con la mutante dominante negativa de dinamina (mutante). Para todos los virus utilizados en este trabajo, la infectividad se vio disminuida cuando las células expresaban la mutante (figura 11). Estos resultados sugieren que todos los virus utilizados en este estudio tienen una clara dependencia por dinamina. Para todos los virus, la expresión de la proteína silvestre de dinamina no afectó su infectividad.

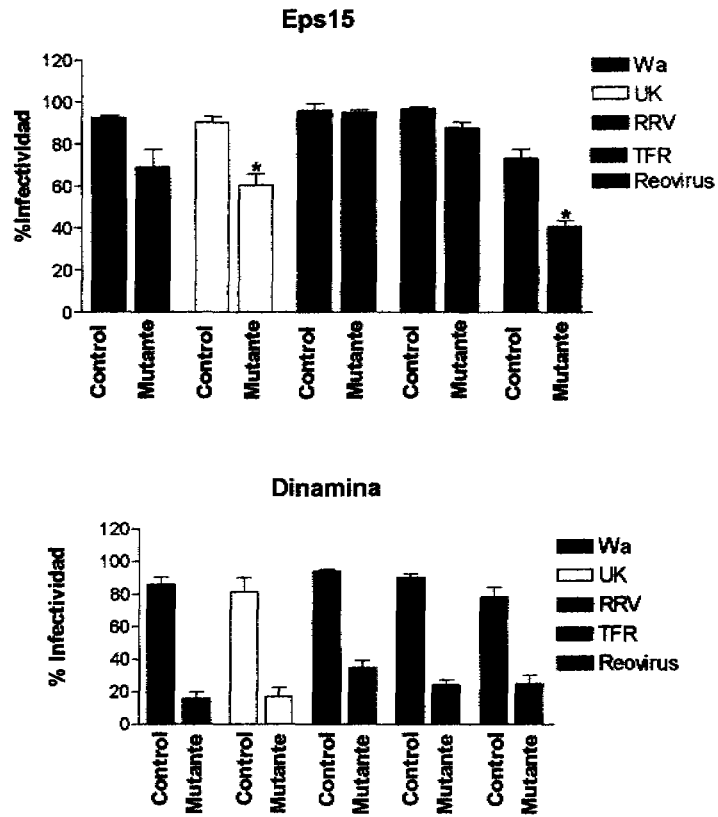


Figura 11. Efecto de la expresión de mutantes dominantes negativas de *eps15* y *dinamina* sobre la infectividad de rotavirus. Las células MA104 fueron transfectadas con los diferentes plásmidos (ver materiales y métodos) y después de 48 horas las células fueron infectadas con los diferentes virus por 8 horas. Después de este tiempo, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. Se muestran gráficamente los resultados de la tabla 3.

VIII. DISCUSIÓN

Existen diferentes rutas de endocitosis que pueden ser usadas por los virus para entrar a la célula. En este trabajo evaluamos el papel de diferentes componentes de la ruta de endocitosis en la entrada de cuatro cepas de rotavirus. Dado que estas cepas de rotavirus, provenientes de diferentes huéspedes animales, tienen diferentes requerimientos por los receptores celulares decidimos evaluar si esas diferencias marcaban distintas preferencias en la vía de endocitosis utilizada por estos virus.

El primer componente evaluado en este trabajo fue el papel del pH. Seguimos varias estrategias, la primera fue el uso de inhibidores de la acidificación endosomal, el cloruro de amonio y la bafilomicina. El tratamiento con cloruro de amonio afectó la infectividad de las cepas siálico independientes Wa y UK mientras que la infectividad de las cepas siálico dependientes, RRV y TFR no se vio afectada. Este resultado sugiere que la entrada de las cepas Wa y UK depende de la acidificación endosomal. Cuando las células fueron tratadas con la bafilomicina, inhibidor de la ATPasa vacuolar presente en los endosomas, la infectividad de las cepas Wa y UK disminuyó. Con esta droga la infectividad de las cepas TFR y RRV también se vio afectada. Dado que el mecanismo de inhibición de ambos reactivos es diferente y que la ATPasa vacuolar tiene múltiples funciones [57], la disminución en la infectividad de RRV y TFR observada con la bafilomicina podría explicarse de varias maneras. En primer lugar, la inhibición de la acidificación de los endosomas podría evitar el reclutamiento de proteínas involucradas en el tráfico vesicular a los endosomas,

esto podría evitar que rotavirus llegase al sitio necesario en la célula para llevar a cabo una replicación exitosa. Existen varios reportes donde han observado que en células tratadas con bafilomicina el transporte de marcadores endocíticos es bloqueado [58, 59]; dicho efecto es menos eficiente para el cloruro de amonio [58]. La GTPasa Arf1 es un ejemplo de una proteína que requiere el pH ácido de los endosomas para asociarse a estas estructuras celulares. Esta GTPasa pertenece a la familia de las proteínas Arf las cuales regulan, entre otras cosas, el tráfico vesicular [60]. Recientemente se demostró que Arf1 es necesaria para la formación de vesículas intermediarias que transportan la carga de los endosomas tempranos a los endosomas tardíos, llamados ECVs (endosomal carrier vesicles) [61]. El reclutamiento de Arf1 a los endosomas promueve la asociación de las proteínas β -COP que son importantes para la formación de los ECVs [62]. La asociación de Arf1 depende del pH ácido, dado que al neutralizar el pH en los endosomas, la asociación de Arf1 se ve disminuida y en consecuencia el reclutamiento de las proteínas β -COP lo que conlleva a la inhibición de la formación de los ECVs. Por otra parte, cada vez hay más evidencia que sugiere que la ATPasa vacuolar, blanco de la bafilomicina, es importante en el tráfico intracelular. Existen reportes donde se ha encontrado que algunas subunidades de la ATPasa interactúan con proteínas involucradas en el tráfico intracelular [63]. Recientemente se describió que la subunidad reguladora de la ATPasa vacuolar interactúa con una proteína viral de HIV facilitando la internalización de receptores celulares [64]. Al parecer la ATPasa vacuolar podría tener otros papeles igualmente importantes además del transporte de protones también relacionados con la endocitosis.

Otra estrategia usada para estudiar la importancia del pH sobre la entrada del virus fue la pre-incubación de las partículas virales a pH ácido (intervalo 5-7). El requerimiento de los virus por el pH ácido se asocia con cambios conformacionales en la partícula que promueven la exposición de péptidos de fusión que facilitan su liberación al citosol. Existen ejemplos en los que virus que son expuestos a pH ácido antes de entrar a la célula son inactivados dado que se realizó el cambio conformacional en un compartimiento no apropiado [30]. Para rotavirus, la pre-incubación en pH ácido no afectó la infectividad del virus.

Continuando con la evaluación del papel del pH en la entrada de rotavirus, probamos el papel de dos proteasas endosomales, las catepsinas B y L. Las catepsinas son enzimas que para estar activas requieren el pH ácido de los endosomas. Existen varios reportes de virus cuya dependencia de pH esta dada no por el pH *per se*, sino por la participación de estas proteasas (cuya actividad depende de pH) [31, 52, 53]. Dada la aparente dependencia de pH de las cepas Wa y UK, resistentes a neuraminidasa, decidimos evaluar el papel de las proteasas endosomales mediante el uso de inhibidores específicos de estas proteasas. Cuando usamos el inhibidor para la catepsina L, obtuvimos una disminución clara en la infectividad de reovirus lo cual ya se había reportado y lo que nos habla de la efectividad de este inhibidor [52]. Sin embargo, la infectividad de las cepas de rotavirus no se afectó significativamente con este inhibidor. Estos resultados sugieren que la catepsina L no tiene un papel fundamental en la entrada de las cepas dependientes de pH, Wa y UK, de rotavirus. Sobre el efecto de la inhibición de la catepsina B, la infectividad de las

cepas de rotavirus no se vio afectada, sin embargo, el efecto que tuvo este inhibidor sobre la infectividad de reovirus, ya reportado previamente pero en otra línea celular [52], no fue claro. A pesar de que los inhibidores de las catepsinas B y L no tuvieron un efecto obvio en la infección de rotavirus, cabe la posibilidad de que otras proteasas endosomales u otros componentes endosomales que sean dependientes de pH sean necesarios para promover la liberación de rotavirus. El papel de otras catepsinas como la catepsina D pudiera ser analizado en un futuro.

Dada la dependencia de pH de las cepas siálico independientes Wa y UK, decidimos evaluar si el mecanismo de entrada utilizado era la endocitosis mediada por clatrina ya que la mayoría de las moléculas internalizadas por esta vía entran a la ruta endocítica. Para esto, realizamos como primer acercamiento tratamientos con sacarosa la cual inhibe la endocitosis mediada por clatrina al promover la polimerización de clatrina de manera inadecuada [54, 55]. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas Wa y UK, resistentes a neuraminidasa, pudieran entrar a las células por endocitosis mediada por clatrina. Ensayos de unión en sacarosa mostraron que la disminución en la infectividad de estas cepas se debe a una inhibición en la entrada y no en la unión de estas cepas a la célula. Por otro lado, la entrada de las cepas TFR y RRV, sensibles a neuraminidasa, no se vieron afectadas ni por el tratamiento con sacarosa ni en los ensayos de unión lo cual sugiere que estas cepas pudieran entrar a las células por una vía diferente.

Para evaluar de manera más específica el papel de la endocitosis mediada por clatrina, utilizamos una mutante dominante negativa de la proteína eps15 que bloquea el ensamble de la malla de clatrina que cubre la vesícula [49]. Además, utilizamos una mutante dominante negativa de dinamina la cual no puede unir ni hidrolizar GTP evitando la liberación de la vesícula endocítica [65]. Con respecto al papel de dinamina, se obtuvo una clara inhibición en la infectividad de todas las cepas utilizadas en este estudio cuando las células expresaban la mutante. Este resultado sugiere que las cepas de rotavirus utilizadas en este trabajo pudieran entrar a la célula por endocitosis dependiente de dinamina. Con respecto a la mutante de eps15, obtuvimos los siguientes resultados: la infectividad de las cepas sensibles a neuraminidasa, TFR y RRV, no se vio afectada por la expresión de esta mutante lo cual va de acuerdo con los resultados obtenidos con los tratamientos con sacarosa y los resultados previos de nuestro grupo (Sánchez C *et al*, resultados sin publicar). En conjunto, estos resultados sugieren que la entrada de estas cepas sensibles a neuraminidasa es independiente de la endocitosis mediada por clatrina. Para las cepas resistentes a neuraminidasa, UK y Wa, obtuvimos resultados discrepantes con las distintas estrategias utilizadas. En el caso de la cepa UK, ésta mostró una ligera inhibición (pero estadísticamente significativa) en su infectividad cuando las células expresaban la mutante de eps15. Este resultado va de acuerdo a lo obtenido para esta cepa con los tratamientos con sacarosa y sugiere que efectivamente la cepa UK podría depender de la endocitosis mediada por clatrina para su entrada. Sin embargo, la cepa Wa, también resistente a neuraminidasa, mostró una ligera disminución en la infectividad que no fue significativa lo que difiere de los tratamientos con sacarosa. La diferencia

obtenida usando ambas estrategias podría deberse a que la proteína eps15 no sea la mejor opción para evaluar el papel de la endocitosis mediada por clatrina. Recientemente, se ha reportado que existen diferentes poblaciones de vesículas de clatrina las cuales parecen requerir de diferentes proteínas para su formación [19, 66]. El silenciamiento de la cadena pesada de clatrina mediante siRNAs sería una estrategia que nos permitiría confirmar de manera clara y específica la aparente dependencia de esta vía endocítica por las cepas resistentes a neuraminidasa, Wa y UK. Cabe mencionar que esta estrategia ya ha sido utilizada en otros estudios para inhibir esta ruta [19, 34, 66, 67].

En base a los resultados anteriores podemos clasificar a las cepas resistentes a neuraminidasa, Wa y UK, como dependientes de pH y aparentemente, dependientes de la endocitosis mediada por clatrina mientras que la entrada de las cepas sensibles a neuraminidasa, TFR y RRV, parece ser independiente de pH y de la endocitosis mediada por clatrina. La entrada de las cuatro cepas depende de dinamina, una enzima involucrada en la liberación de la vesícula endocítica proveniente de diferentes vías de endocitosis (tabla 4).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el requerimiento por el ácido siálico parece marcar una diferencia en la vía de entrada en las cepas de rotavirus. Aún no hemos identificado la identidad bioquímica del receptor sialado pero al parecer la interacción de las cepas de rotavirus sensibles a neuraminidasa (RRV y TFR) con este receptor y/o el conjunto de interacciones con los otros receptores celulares podría desembocar en una serie de señales que favorecen su internalización por una vía independiente de la

endocitosis mediada por clatrina que aún no ha sido precisamente identificada pero que es dependiente de dinamina. En el caso de las cepas resistentes a neuraminidasa (Wa y UK) el orden y/o el conjunto de interacciones con los receptores celulares podrían favorecer su internalización por la vía de endocitosis mediada por clatrina. Sería interesante evaluar la vía de entrada de la cepa de rotavirus nar3, una variante de RRV aislada en el laboratorio [56] que es resistente a neuraminidasa. Esta cepa utiliza, a diferencia de RRV, a la integrina $\alpha 2\beta 1$ como un receptor de unión inicial [68]. Podría ser que la diferencia en el orden secuencial de las interacciones establezca una diferencia en la vía de entrada. Estas posibilidades están aún por estudiarse.

IX. RESUMEN

Tabla 4. Resumen del efecto de las drogas y dominantes negativas usadas en este trabajo

Tratamiento		Resistentes a neuraminidasa		Sensibles a neuraminidasa		Reovirus
		Integrina dependiente	Integrina independiente	Integrina dependiente	Integrina independiente	
		Wa	UK	RRV	TFR	
Drogas	NH ₄ Cl	++	++	--	--	++
	Bafilomicina	++	+	+	+	++
	Sacarosa	++	++	-	-	++
Inhibidores	Catepsina B	-	-	-	-	-
	Catepsina L	-	-	--	-	++
Dominantes Negativas	Eps15mut	-	+	-	-	++
	DynK44A	++	++	++	++	++

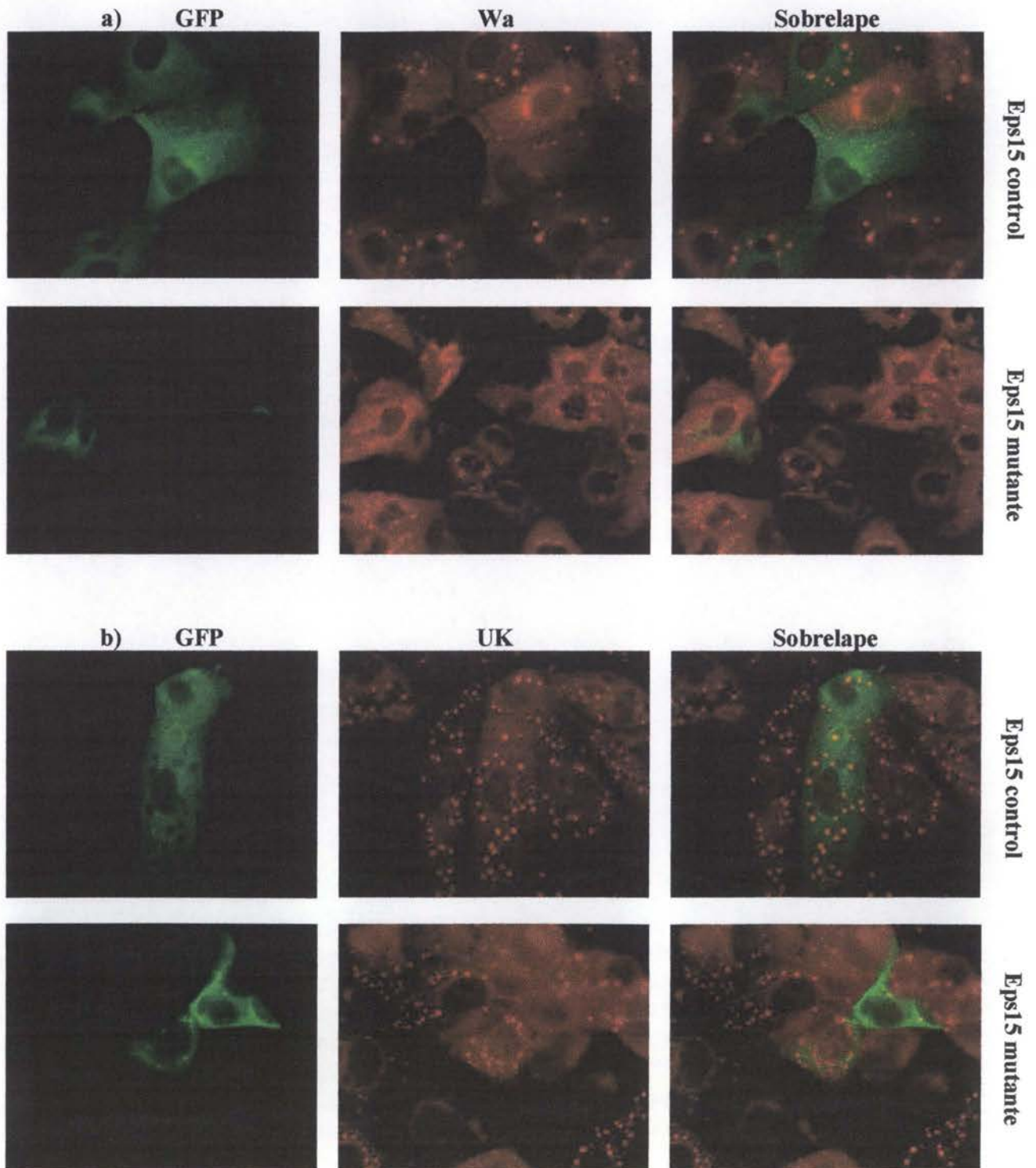
- No se afecta la infectividad
- + Disminución en la infectividad igual o menor al 50%
- ++ Disminución en la infectividad mayor al 50%

X. CONCLUSIONES

- El uso del ácido siálico como receptor parece marcar una diferencia en la vía de entrada de las cepas de rotavirus a la célula huésped
- Las cepas que dependen de ácido siálico (sensibles a neuraminidasa), RRV y TFR, no dependen de clatrina pero sí de dinamina para su entrada a la célula
- Aparentemente, la entrada de RRV y TFR no depende de pH.
- Posiblemente, las cepas que no necesitan ácido siálico (resistentes a neuraminidasa), Wa y UK, entran a la célula hospedera vía la endocitosis mediada por clatrina
- La entrada de las cepas Wa y UK a la célula huésped es dependiente de pH lo cual va de acuerdo con su internalización vía endocitosis mediada por clatrina, sin embargo se requiere confirmar estos datos

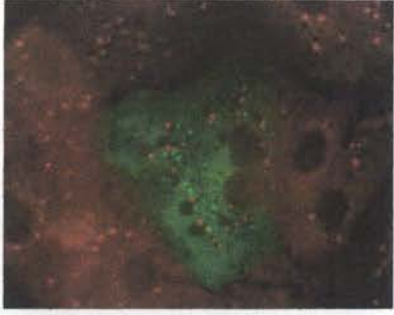
XI. ANEXOS

Anexo 1. Efecto de la expresión de la mutante de eps15 en la infectividad de rotavirus

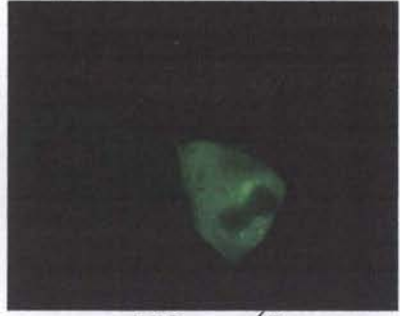
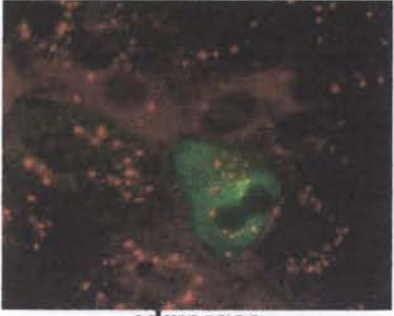


Continuación...

Eps15 mutante



Eps15 control

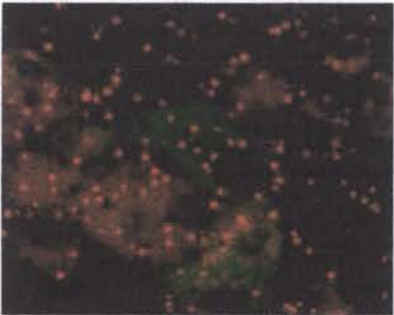


Sobrelape

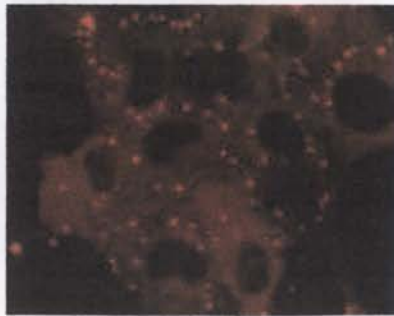
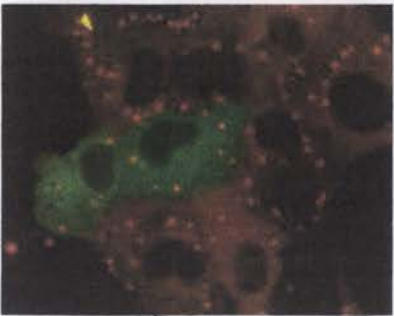
RRV

d) GFP

Eps15 mutante



Eps15 control

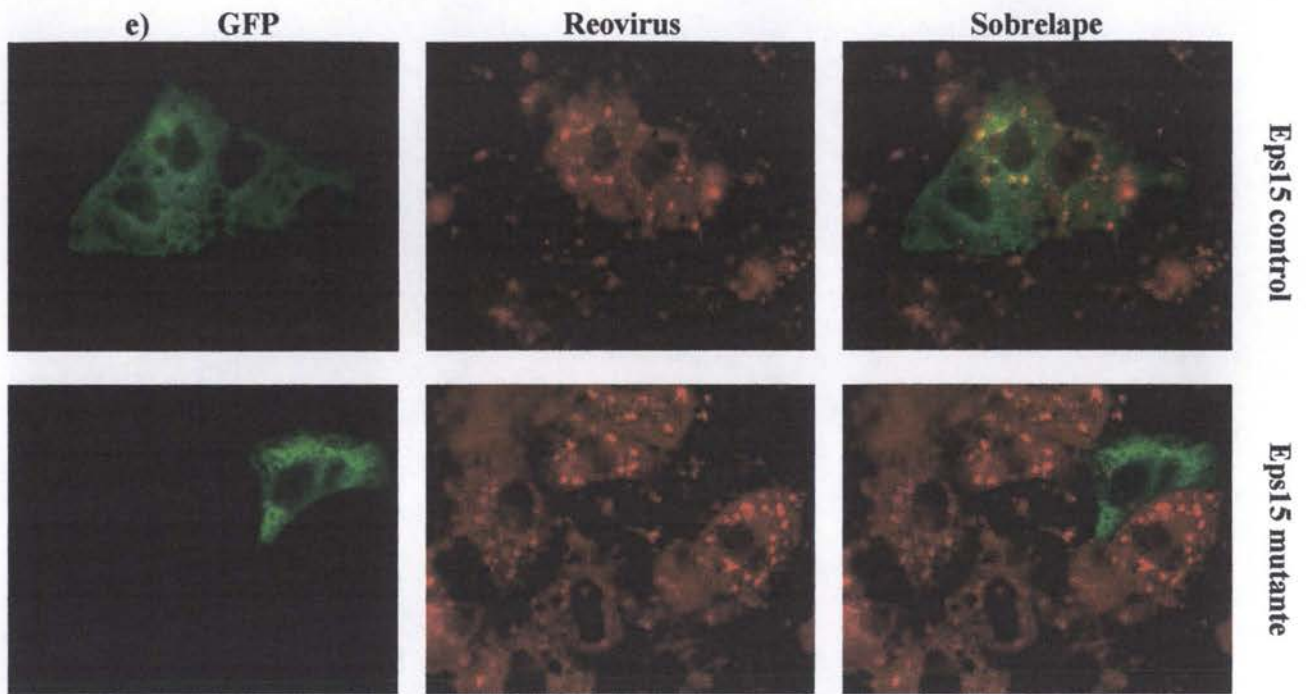


Sobrelape

TFR

e) GFP

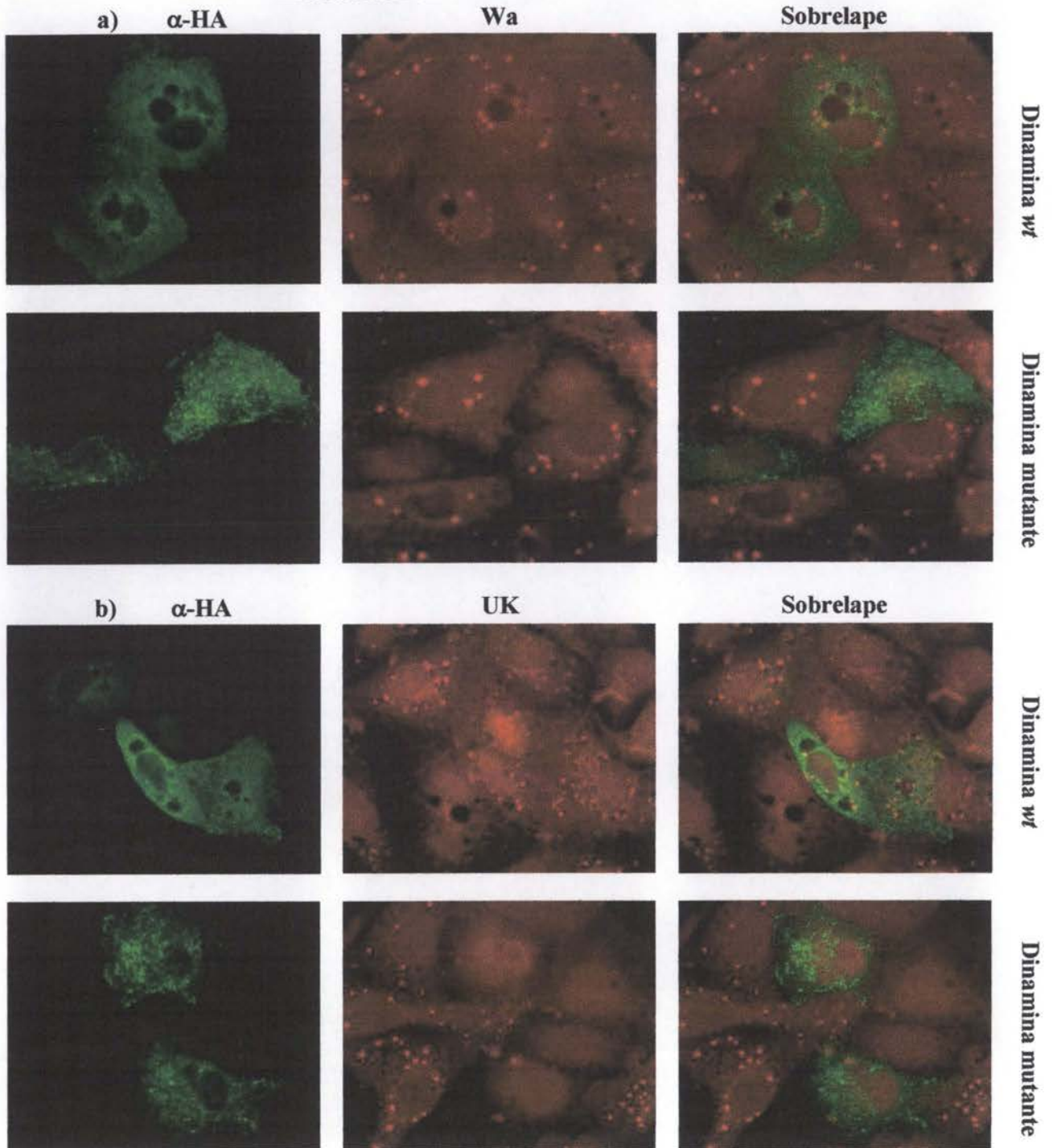
Continuación...



Anexo 1. Efecto de la expresión de la mutante de *eps15* en la infectividad de rotavirus.

Las células MA104 fueron transfectadas con los plásmidos de la proteína control (*eps15* control) o de la mutante dominante negativa (*eps15* mutante) y después de 48 horas las células fueron infectadas con a) Wa, b) UK, c) TFR, d) RRV o e) Reovirus por 8 horas. Después de este tiempo, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. La expresión de ambas proteínas de *eps15* fue detectada por la expresión de GFP. La infección por Wa, RRV, TFR y UK fue monitoreada usando un anticuerpo de conejo anti-NSP2 (proteína no estructural de rotavirus) y para la infección con Reovirus fue detectada usando un anticuerpo de conejo anti-Reovirus, seguidos de la incubación con un anticuerpo anti-conejo Alexa 568.

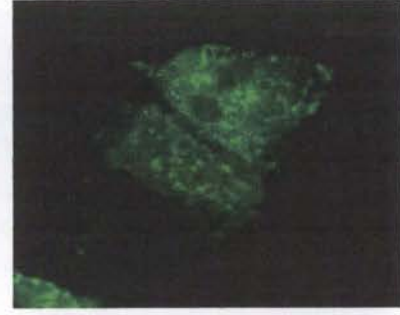
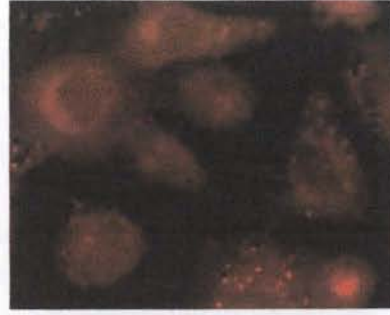
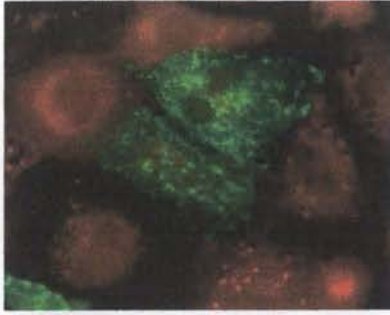
Anexo 2. Efecto de la expresión de la mutante de dinamina en la infectividad de rotavirus



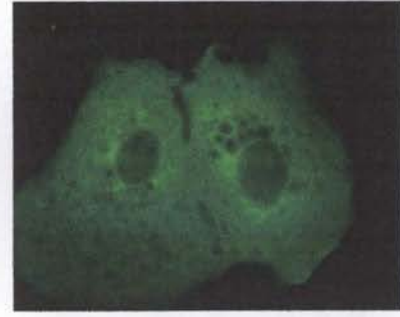
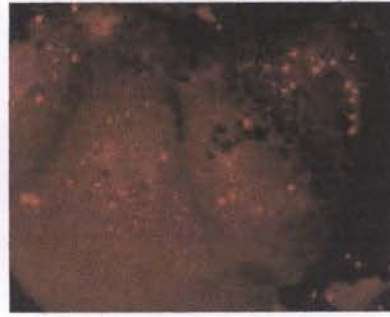
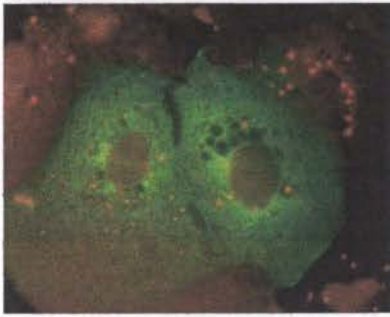
Continuación...

Continuación...

Dinamina mutante



Dinamina wt

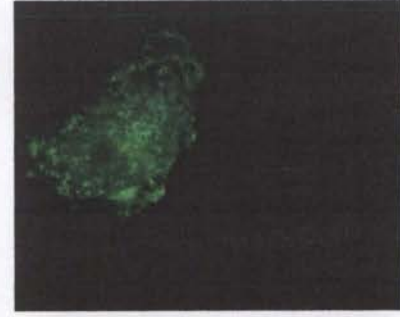
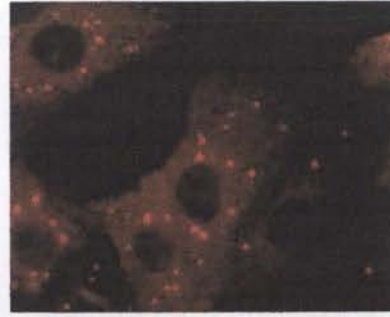
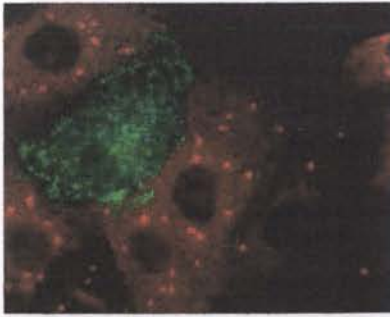


Sobrelape

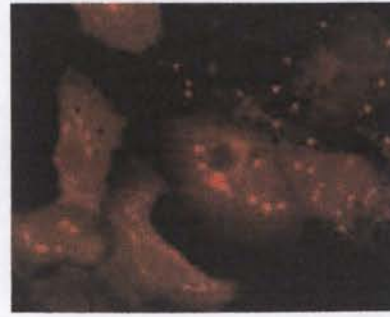
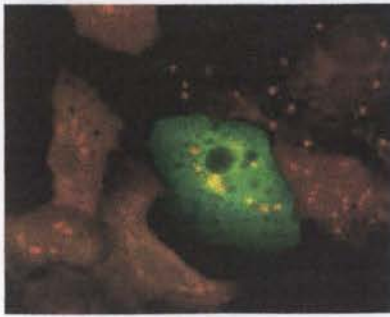
RRV

α -HA (d)

Dinamina mutante



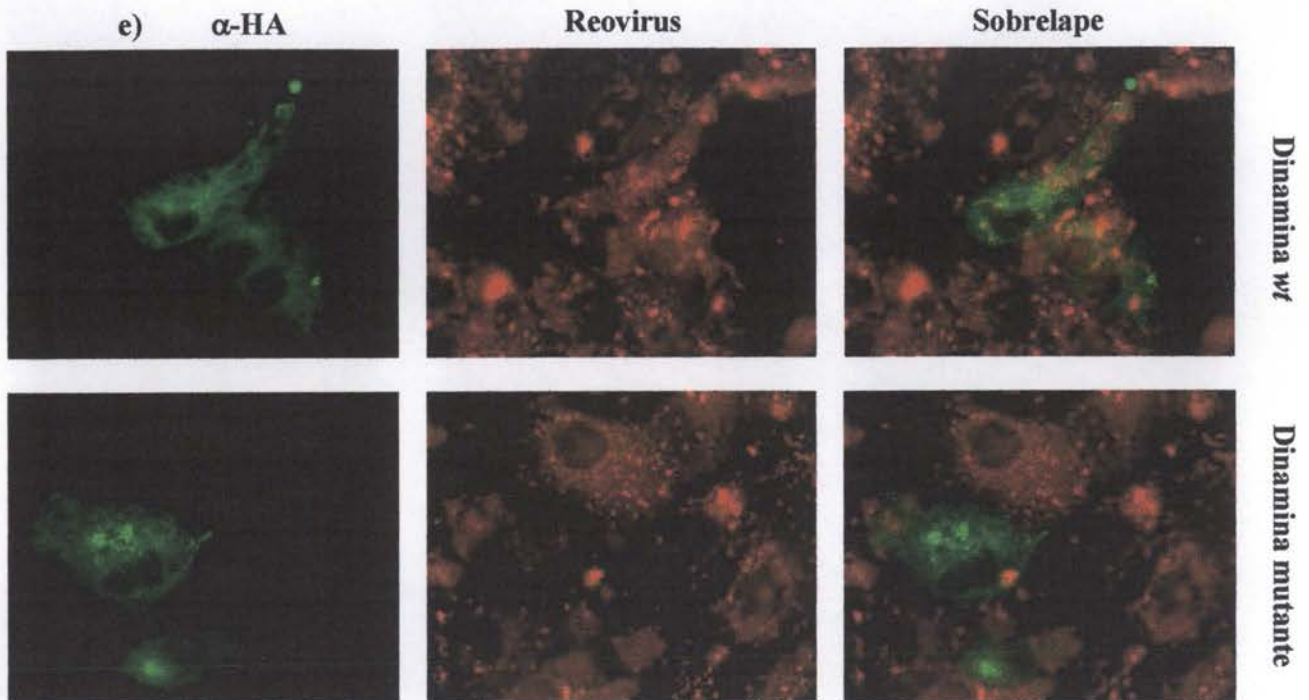
Dinamina wt



Sobrelape

TFR

α -HA (c)



Anexo 2. Efecto de la expresión de la mutante de dinamina en la infectividad de rotavirus.

Las células MA104 fueron transfectadas con los plásmidos de dinamina silvestre (*Dinamina wt*) o de la mutante dominante negativa (*Dinamina mutante*) y después de 48 horas las células fueron infectadas con a) Wa, b) UK, c) TFR, d) RRV o e) Reovirus por 8 horas. Después de este tiempo, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia. La expresión de ambas proteínas de dinamina fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-HA seguido de la incubación con un anticuerpo anti-ratón Alexa 488. Las infecciones con Wa, RRV, TFR, UK y Reovirus fueron detectadas como se indica en el pie del anexo 1.

XII. REFERENCIAS

1. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-72.
2. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 1988;62:1136-44.
3. Graham KL, Halasz P, Tan Y, et al. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol* 2003;77:9969-78.
4. Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol* 1996;70:4877-83.
5. Lopez S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 2004;12:271-8.
6. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5389-94.
7. Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* 2000;74:228-36.
8. Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, et al. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol* 2002;76:1109-23.
9. Guerrero CA, Bouyssouade D, Zarate S, et al. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* 2002;76:4096-102.
10. Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R, et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* 2003;77:7254-60.
11. Guerrero CA, Zarate S, Corkidi G, Lopez S, Arias CF. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* 2000;74:9362-71.
12. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* 2004;78:2310-8.
13. Isa P, Realpe M, Romero P, Lopez S, Arias CF. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 2004;322:370-81.
14. Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745:273-86.
15. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 2003;72:395-447.
16. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell* 2006;124:729-40.
17. Maruoka N, Murata T, Omata N, et al. Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: A dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:178-86.

18. Judah JD, Howell KE, Taylor JA, Quinn PS. Potassium depletion inhibits the intracellular transport of secretory proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J Cell Sci* 1989;92 (Pt 2):173-85.
19. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 2003;162:909-18.
20. Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6775-80.
21. Misinzo G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol* 2005;86:2057-68.
22. Garcia ML, King VF, Shevell JL, et al. Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J Biol Chem* 1990;265:3763-71.
23. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev Cell* 2002;2:411-23.
24. Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Utry-Varsat A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 2001;7:661-71.
25. Takei K, Haucke V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol* 2001;11:385-91.
26. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:483-519.
27. Benmerah A, Gagnon J, Begue B, Megarbane B, Utry-Varsat A, Cerf-Bensussan N. The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J Cell Biol* 1995;131:1831-8.
28. Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* 2002;4:691-8.
29. Orth JD, McNiven MA. Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:31-9.
30. Puri A, Booy FP, Doms RW, White JM, Blumenthal R. Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. *J Virol* 1990;64:3824-32.
31. Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 2005;308:1643-5.
32. Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, Fries E. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* 1980;84:404-20.
33. Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 2004;78:10543-55.
34. Sun X, Yau VK, Briggs BJ, Whittaker GR. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 2005;338:53-60.

35. Jin M, Park J, Lee S, et al. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* 2002;294:60-9.
36. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307:1-11.
37. Krajewska WM, Maslowska I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:195-220.
38. Pelkmans L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:295-304.
39. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2003;161:673-7.
40. Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996;7:1825-34.
41. Beer C, Andersen DS, Rojek A, Pedersen L. Caveola-dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J Virol* 2005;79:10776-87.
42. Marjomaki V, Pietiainen V, Matilainen H, et al. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J Virol* 2002;76:1856-65.
43. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002;296:535-9.
44. Gilbert JM, Benjamin TL. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* 2000;74:8582-8.
45. Sauvonnnet N, Dujeancourt A, utry-Varsat A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *J Cell Biol* 2005;168:155-63.
46. Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 2001;75:11166-77.
47. Cuadras MA, Arias CF, Lopez S. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. *J Virol* 1997;71:9065-74.
48. Arias CF, Lizano M, Lopez S. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J Gen Virol* 1987;68 (Pt 3):633-42.
49. Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, utry-Varsat A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 9):1303-11.
50. Sturzenbecker LJ, Nibert M, Furlong D, Fields BN. Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J Virol* 1987;61:2351-61.
51. Martinez CG, Guinea R, Benavente J, Carrasco L. The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. *J Virol* 1996;70:576-9.
52. Ebert DH, Deussing J, Peters C, Dermody TS. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* 2002;277:24609-17.
53. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11876-81.

54. Heuser JE, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 1989;108:389-400.
55. Hansen SH, Sandvig K, van DB. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* 1993;121:61-72.
56. Mendez E, Lopez S, Cuadras MA, Romero P, Arias CF. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* 1999;263:450-9.
57. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:94-103.
58. Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 1994;269:21-4.
59. Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* 1998;72:9645-55.
60. Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:347-58.
61. Gu F, Gruenberg J. ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J Biol Chem* 2000;275:8154-60.
62. Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J. An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol* 1996;133:29-41.
63. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El AJ, et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 2006;8:124-36.
64. Geyer M, Yu H, Mandic R, et al. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J Biol Chem* 2002;277:28521-9.
65. Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 1994;127:915-34.
66. Veiga E, Cossart P. *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2005;7:894-900.
67. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006;80:6964-72.
68. Zarate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, Lopez S. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 2000;278:50-4.