



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LOS FACTORES VIRALES INVOLUCRADOS EN LOS
MECANISMOS DE ENDOCITOSIS Y TRÁFICO VESICULAR ASOCIADOS
A LA ENTRADA DE LOS ROTAVIRUS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
MARCO AURELIO DÍAZ SALINAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ (IBT-UNAM)

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA (IBT-UNAM)
DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN (CINVESTAV-IPN)

CUERNAVACA, MORELOS. OCTUBRE 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de los doctores Carlos F. Arias y Susana López, perteneciente al Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La dirección del mismo estuvo bajo la tutela del Dr. Carlos F. Arias Ortiz.

Durante la realización del proyecto de tesis, se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México (becario núm. 207259).

Comité tutor:

Dra. María Alejandra Bravo de la Parra
Dr. Juan Ernesto Ludert León
Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Jurado de examen de grado:

Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Dr. José Luis Montiel
Dr. Ramón González García-Conde
Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

***Dedicada a Yvette
y a nuestras familias.***

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Carlos Arias y a Susana López por sus enseñanzas, consejos, y por haberme permitido formar parte de su laboratorio.

A mis excelentes maestros de laboratorio y colaboradores Pedro Romero y Rafaela Espinoza. Gracias por todas sus enseñanzas y por su amistad.

Agradezco a Ernesto Méndez, Tomás López y Pavel Isa por sus valiosas críticas, comentarios y discusiones. Gracias por siempre haber tenido el tiempo para ayudarme resolver mis dudas.

A Lilí Sánchez y a mi tocayo Marco Antonio (MAET) por su apoyo en los últimos meses de mi estancia en el laboratorio y por su amistad.

Agradezco a Lorena, Nayeli y Silvia por todo el valioso apoyo técnico que siempre me brindaron.

A los queridos galitos que me fueron contemporáneos.

Al siempre eficiente equipo de la Unidad de Docencia del IBt-UNAM; muchas gracias Gloria, Toño y Jalil.

A mis amigos y compañeros del IBt y CCG de la UNAM.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|-----------|
| I. LISTA DE ABREVIATURAS | 3 |
| II. ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| III. ÍNDICE DE TABLAS | 6 |
| IV. RESUMEN | 7 |
| V. ABSTRACT | 8 |
| VI. INTRODUCCIÓN | 9 |
| VI.1. Generalidades sobre rotavirus | 9 |
| VI.2. La proteína VP4 | 11 |
| VI.3. La proteína VP7 | 14 |
| VI.4. Rotavirus rearreglantes | 15 |
| VI.5. Entrada de rotavirus a la célula | 16 |
| VI.6. Endocitosis | 20 |
| VI.6.1. Endocitosis dependiente de clatrina | 21 |
| VI.6.2. Endocitosis independiente de clatrina (EIC) | 22 |
| VI.6.2.1. EIC dependiente de dinamina y caveolina | 23 |
| VI.6.2.2. EIC dependiente de dinamina y RhoA | 23 |
| VI.6.2.3. EIC independiente de dinamina | 23 |
| VI.6.3. Fagocitosis y macropinocitosis | 24 |
| VI.7. Tráfico vesicular | 24 |
| VII. ANTECEDENTES | 28 |
| VIII. JUSTIFICACIÓN | 31 |
| IX. HIPÓTESIS | 32 |
| X. OBJETIVOS | 32 |
| X.1. Objetivo General | 32 |
| X.2. Objetivos Particulares | 32 |
| XI. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| XII. RESULTADOS | 37 |
| XII. 1. Identificación de las proteínas virales implicadas en la endocitosis mediada por clatrina del rotavirus UK | 37 |
| XII. 2. Identificación de las proteínas virales implicadas en la endocitosis de RRV | 41 |
| XII. 3. Identificación de los dominios de VP4 de RRV implicados en los mecanismos de endocitosis en células MA104 | 43 |
| XII. 4. Caracterización del tráfico vesicular de los rotavirus UK, RRV, los rearreglantes UKxRRV y Nar3 | 46 |
| XII. 5. Caracterización de la vía de entrada de cepas de rotavirus que tienen diferentes requerimientos de receptores celulares | 52 |
| XII. 6. Evaluación de las catepsinas como potenciales factores celulares involucrados en la entrada de los rotavirus | 54 |

ÍNDICE GENERAL

(continuación...)

| | Página |
|---|---------------|
| XIII. DISCUSIÓN | 61 |
| XIV. CONCLUSIONES | 67 |
| XV. PERSPECTIVAS | 68 |
| XVI. REFERENCIAS | 69 |
| XVII. ANEXO 1. Artículo publicado en “Journal of Virology”: “The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells”. | 78 |
| XVIII. ANEXO 2. Artículo publicado en “Journal of Virology”: “Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell”. | 86 |

I. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- aa.** Aminoácido.
- CHC.** Cadena pesada de clatrina.
- CD-M6PR.** Receptor de manosa-6-fosfato dependiente de catión.
- CME.** Criomicroscopía electrónica.
- CTSB.** Catepsina B.
- CTSL.** Catepsina L.
- CTSL1.** Catepsina L isoforma 1.
- CTSS.** Catepsina S.
- DLPs.** Partículas de rotavirus de doble capa (siglas de “double-layered particle”).
- DMSO.** Dimetil sulfóxido.
- DS-1.** Rotavirus cepa humana DS-1.
- dsRNA.** Ácido ribonucleico de doble cadena (siglas de “double-stranded ribonucleic acid”).
- EE.** Endosomas tempranos (siglas de “early endosomes”).
- EEA1.** Antígeno 1 de endosomas tempranos (siglas de “early endosome antigen 1”).
- EGTA.** Ácido etilenglicol tetra acético.
- EIC.** Endocitosis independiente de clatrina.
- ELISA.** Ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzimas (siglas de “enzyme-linked immuno sorbent assay”).
- ESCRT.** Complejo endosomal requerido para transporte (siglas de “endosomal sorting complex required for transport”).
- hpi.** Horas post-infección.
- Hsc70.** Proteína constitutiva de estrés calórico 70 (“heat shock cognate 70”).
- LDH.** Lactato deshidrogenasa.
- LE.** Endosomas tardíos (siglas de “late endosomes”).
- M6PRs.** Receptores de manosa-6-fosfato.
- ME.** Endosomas en maduración (siglas de “maturing endosomes”).
- MEM.** Medio mínimo esencial siglas de (“minimal essential medium”).
- MOI.** Multiplicidad de infección (siglas de “multiplicity of infection”).
- MVB.** Cuerpos multivesiculares (siglas de “multivesicular bodies”).
- NA.** Neuraminidasa.
- Nar3.** Rotavirus variante de RRV resistente a neuraminidasa, clona 3.
- rNar3-14.** Rotavirus revertante de Nar3, clona 14.
- rNar3-18.** Rotavirus revertante de Nar3, clona 18.
- RNAi.** Interferencia de RNA.
- RT-PCR.** Reacción de transcripción reversa seguida por la reacción en cadena de la DNA polimerasa.
- ReoT1.** Reovirus de mamífero tipo 1 cepa Lang (ReoT1L).
- ReoT3.** Reovirus de mamífero tipo 3 cepa Dearing (ReoT3D).
- RRV.** Rotavirus de simio “Rhesus rotavirus”.
- SA.** Ácido siálico, ácido N-acetilneuramínico.
- SA11.** Rotavirus de simio cepa SA11-4S.

SFB. Suero fetal bovino.

siRNA. Pequeños RNAs interferentes (siglas de “small interfering RNA”).

TGN. Red trans del aparato de Golgi (siglas de “trans Golgi network”).

TLPs. Partículas de triple capa (siglas “triple-layered particle”).

uff. Unidades formadoras de focos infecciosos.

UK. Rotavirus bovino UK.

Vim. Vimentina.

Wa. Rotavirus cepa humana Wa.

WI61. Rotavirus cepa humana WI61.

YM. Rotavirus cepa porcina YM.

II. ÍNDICE DE FIGURAS

| | PÁGINA |
|---|--------|
| Figura 1. Estructura del rotavirus. | 10 |
| Figura 2. Esquema de la proteína VP4 y sus dominios característicos. | 12 |
| Figura 3. Esquema de la proteína VP7 y sus dominios característicos. | 14 |
| Figura 4. Modelo de las interacciones tempranas entre rotavirus y la célula huésped. | 17 |
| Figura 5. Esquema de los principales mecanismos de endocitosis. | 21 |
| Figura 6. Efecto de tratamientos celulares que inhiben endocitosis mediada por clatrina en la infectividad de diferentes virus. | 39 |
| Figura 7. Identificación de la proteína VP4 como el factor viral implicado en los mecanismos de endocitosis de RRV en células MA104. | 43 |
| Figura 8. Identificación de los dominios de VP4 implicados en los mecanismos de endocitosis de RRV en células MA104. | 44 |
| Figura 9. Efecto del silenciamiento de la expresión de proteínas regulatorias de tráfico vesicular en la infectividad de diferentes rotavirus. | 47 |
| Figura 10. Efecto del silenciamiento de la expresión de CD-M6PR en la infectividad de los rearreglantes UKxRRV y de las variantes de RRV. | 50 |
| Figura 11. Efecto de tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina o del silenciamiento de la expresión de proteínas de tráfico vesicular en la infectividad de diferentes virus. | 53 |
| Figura 12. Efecto del tratamiento de las células con inhibidores de proteasas en la infectividad de diferentes virus. | 56 |
| Figura 13. Efecto del silenciamiento de la expresión de diferentes catepsinas en la infectividad de diferentes virus. | 58 |

III. ÍNDICE DE TABLAS

| | PÁGINA |
|--|--------|
| Tabla 1. Moléculas de la superficie celular reconocidas por las proteínas VP4 o VP7, y/o requeridas para la entrada celular de las cepas de rotavirus usadas en este estudio. | 19 |
| Tabla 2. Proteínas de cápside presentes en los virus rearreglantes (rearreglantes UKxRRV) y en los rotavirus progenitores RRV y UK. | 37 |

IV. RESUMEN

Los rotavirus son importantes agentes etiológicos de las gastroenteritis virales en infantes menores de cinco años [1]. La entrada de estos virus en la célula hospedera ocurre mediante diferentes mecanismos de endocitosis. Mientras que el rotavirus bovino UK se internaliza en células MA104 mediante un mecanismo clásico de endocitosis dependiente de clatrina [2], el rotavirus de simio RRV emplea un mecanismo de endocitosis atípico que es independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de dinamina II [3]. Después de su endocitosis, RRV requiere llegar a cuerpos multivesiculares para infectar a la célula [4], mientras que UK aparentemente requiere llegar a endosomas tardíos [5]. Sin embargo, la identidad de los factores virales involucrados en dirigir los mecanismos de endocitosis observados para los rotavirus aún no se conocen, además de que su tráfico vesicular ha sido poco estudiado e inclusive es desconocido para la mayoría de las cepas de estos patógenos.

En este trabajo se estudiaron los factores virales de los rotavirus RRV y UK involucrados en los mecanismos de internalización en la célula huésped mediante enfoques experimentales de RNAi y farmacológicos utilizando un panel de rotavirus rearrreglantes entre estas cepas y virus variantes de RRV.

Los resultados de este trabajo de investigación sugieren sólidamente que la proteína de cápside VP4 es el único factor viral involucrado en dirigir la vía de endocitosis de los rotavirus UK y RRV. También demuestran que el cambio puntual en un aminoácido de VP4 está involucrado en cambiar la ruta de entrada de RRV de una endocitosis independiente de clatrina a una dependiente de ella. Los datos también demuestran que VP4 es el único factor viral asociado con el tráfico vesicular diferente entre estas cepas de rotavirus. Adicionalmente se caracterizó la endocitosis y tráfico vesicular de otras cepas de rotavirus y se descubrió que la mayoría de ellas requieren llegar a endosomas tardíos, así como de la expresión del receptor de manosa-6-fosfato y de la actividad de catepsinas endosomales para entrar en la célula huésped, haciendo de estas proteasas un posible blanco farmacológico en el tratamiento de la gastroenteritis aguda ocasionada por estos virus.

V. ABSTRACT

Rotaviruses are important etiologic agents of severe acute gastroenteritis in children younger than 5 years of age [1]. These viruses are internalized into the host cell through different endocytic mechanisms. Rotavirus bovine strain UK is internalized by a classic clathrin-dependent endocytosis [2], while simian strain RRV enters the cell by an atypical endocytosis that is clathrin- and caveolin-independent, but dynamin II-dependent [3]. After its endocytosis, RRV reaches multivesicular bodies to infect the cell [4], while UK must to reach late endosomes [5]. However, the viral factors that direct the rotavirus endocytosis pathways are unknown. Furthermore, the intracellular vesicular traffic of rotavirus has not been well characterized and it is even unknown for most of rotavirus strains.

In this work we studied the viral factors involved in determining the cell internalization pathway, using RNAi and pharmacological experimental approaches, and a panel of UKxRRV reassortants viruses and mutant variants of RRV.

The results of this work strongly suggested that VP4 capsid protein is the only viral factor that determines the endocytosis route followed by rotaviruses UK and RRV. Moreover, a single amino acid change in VP4 was found to shift the RRV pathway of entry from clathrin-independent to clathrin-dependent. Furthermore, VP4 was shown to be the only viral factor associated to the different vesicular traffic between these two rotavirus strains. Additionally, the endocytosis and vesicular traffic of other model rotavirus strains was characterized. It was found that most of them must to reach late endosomes, the presence of CD-M6PR, and the activity of endosomal cathepsins for cell entry, making of these proteases potential pharmacologic targets for the control of the severe acute gastroenteritis caused by these viruses.

VI. INTRODUCCIÓN

VI.1. GENERALIDADES SOBRE ROTAVIRUS

Los rotavirus son un importante agente etiológico de las gastroenteritis virales en infantes menores de cinco años [1]. Los datos actuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que tan solo en el 2008 ocurrieron 453,000 decesos de infantes en todo el mundo debido a gastroenteritis aguda asociada a este patógeno [6]. Aunque la vacunación contra el rotavirus ha ayudado a disminuir el número promedio de los decesos [6-8], la enfermedad severa ocasionada por este virus sigue representando un problema serio de salud especialmente en países subdesarrollados [9]. Debido a esto, es importante llevar a cabo proyectos de investigación para entender las etapas del ciclo de replicación de estos virus y así poder desarrollar mejores alternativas terapéuticas que ayuden a controlar el cuadro de gastroenteritis agudo que ocasionan y disminuir el número de decesos infantiles anuales.

Los rotavirus carecen de envoltura lipídica y su cápside está conformada por tres capas concéntricas de proteínas que encierran al genoma constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (Fig. 1A). Este genoma codifica para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) [10]. La capa proteica interior del virión está formada por 120 moléculas de la proteína VP2 que encierran al genoma viral, a 12 copias de VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA) y a 12 copias de VP3 (proteína con actividad de guanilil transferasa y metilasa). La capa proteica intermedia está formada por 260 trímeros de VP6 y se ensambla justo por encima de la capa de VP2 (Fig. 1A), generando así partículas de doble capa (DLPs, por sus siglas en inglés).

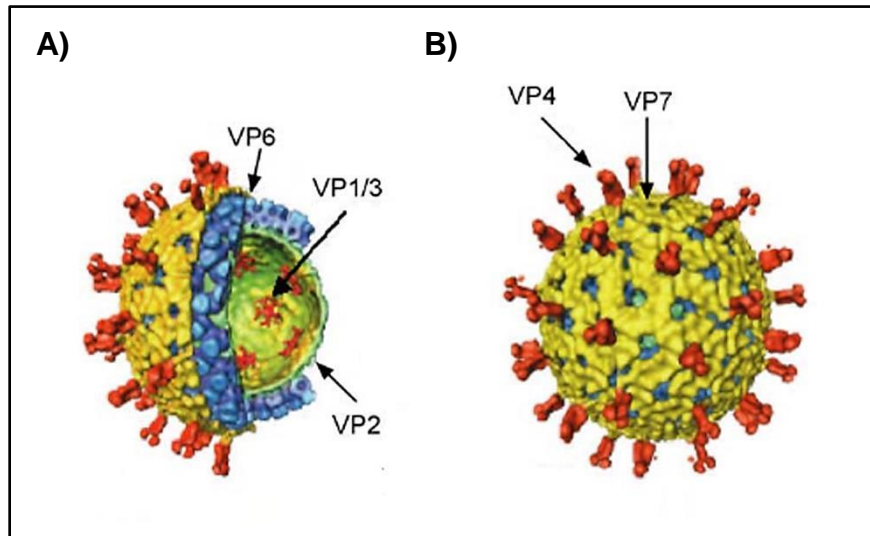


Figura 1. Estructura del rotavirus. Esquemas de la partícula de rotavirus obtenida por reconstrucción de imágenes generadas por criomicroscopía electrónica (CME). Se esquematizan **A)** las proteínas estructurales que conforman a las 3 capas proteicas de la cápside de los rotavirus y, **B)** las proteínas que conforman la capa externa de su cápside. Imagen tomada y modificada de la referencia [11].

La capa externa está compuesta por las proteínas VP4 y VP7 (Fig. 1B), donde 780 copias de la glicoproteína VP7 se organizan en trímeros y se ensamblan sobre las DLPs formando una superficie lisa, mientras que VP4, la cual es una proteína sensible a proteasas, da origen a 60 espículas virales que se proyectan alrededor de 12 nm de la superficie de VP7 en la partícula viral (Fig. 1B). Las DLPs cubiertas con la capa externa compuesta de VP4 y VP7 son conocidas como partículas de triple capa (TLPs, por sus siglas en inglés), y ésta es la estructura que presentan las partículas infecciosas [10].

Los rotavirus se encuentran clasificados dentro de la familia *Reoviridae* y del género *Rotavirus*. Adicionalmente, estos patógenos son clasificados en siete grupos (A-G) con base en la antigenicidad de su proteína VP6. Se ha reportado que sólo los rotavirus pertenecientes a los grupos A-C infectan al humano [12].

Recientemente se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación para los rotavirus en el cual se asigna un genotipo específico para cada uno de los 11 segmentos de dsRNA de algún rotavirus en particular, de acuerdo al porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos con cepas de referencia, de tal manera que para el caso del segmento de dsRNA que codifica para la proteína VP7 (genotipo “G”,

por “Glycoprotein”), existen 27 genotipos diferentes, mientras que para el segmento de RNA que codifica para VP4 ha sido reportada la existencia de 35 genotipos diferentes (genotipo “P”, por “Protease-sensitive”) [13, 14]. La denotación del genotipo de cada cepa de rotavirus se indica entre corchetes seguido del nombre de la misma, por ejemplo, el genotipo de VP4 de las cepas de rotavirus de simio RRV y bovino UK, quedaría como RRV P[3] y UK P[5], respectivamente. Adicionalmente, también ha sido propuesta una subclasificación filogenética de los rotavirus en cinco genogrupos (P[I] a P[V]) con base al nivel de identidad a nivel de nucleótidos de la parte codificante para VP8 del segmento de dsRNA que codifica para la proteína VP4 [15].

Las proteínas VP4 y VP7 (Fig. 1B) han sido ampliamente estudiadas debido a que están involucradas en las interacciones iniciales del virus con la célula huésped [12].

VI.2. LA PROTEÍNA VP4

VP4 es una proteína de aproximadamente 88 kDa codificada por el segmento de dsRNA 4 de los rotavirus. Esta proteína es clave en la entrada del virus a la célula y ha sido ampliamente estudiada desde hace más de 30 años, de tal manera que algunas de sus propiedades identificadas son hemaglutinación [16-19], anclaje a la célula huésped [20], aumento en la infectividad por tratamiento con tripsina [21-23], virulencia y antigenicidad, entre otras [10].

Para ser infeccioso el virus tiene que ser tratado con tripsina, lo cual produce tres cortes muy cercanos en VP4 (aa 231, 241 y 247), generando así dos productos de proteólisis: la proteína VP8 (de 231 aa) localizada en el extremo amino terminal de VP4 y VP5 (de 528 aa) hacia el extremo carboxilo de VP4 (Fig. 2) [12].

La estructura de VP4 se ha definido típicamente por criomicroscopía electrónica (CME) como un dímero formado por dos dominios en forma de cabezas globulares, un cuerpo central y un dominio globular interno que se ancla en VP6, por debajo de la capa lisa de VP7 [24-28]. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que VP4 se ensambla en trímeros debido a que han sido

observadas 3 unidades de VP4 que interaccionan con la capa proteica de VP7 y VP6, lo cual ha llevado a sugerir que una de las cabezas globulares se pierde durante el tratamiento con tripsina, quedando así sólo las dos cabezas descritas en las espículas virales [29, 30].

Tanto la proteína VP8 de los rotavirus como VP5, contienen regiones y motivos de unión a receptores celulares que promueven la interacción con la célula hospedera y están involucrados en el proceso de la entrada del virus a la misma (Fig. 2).

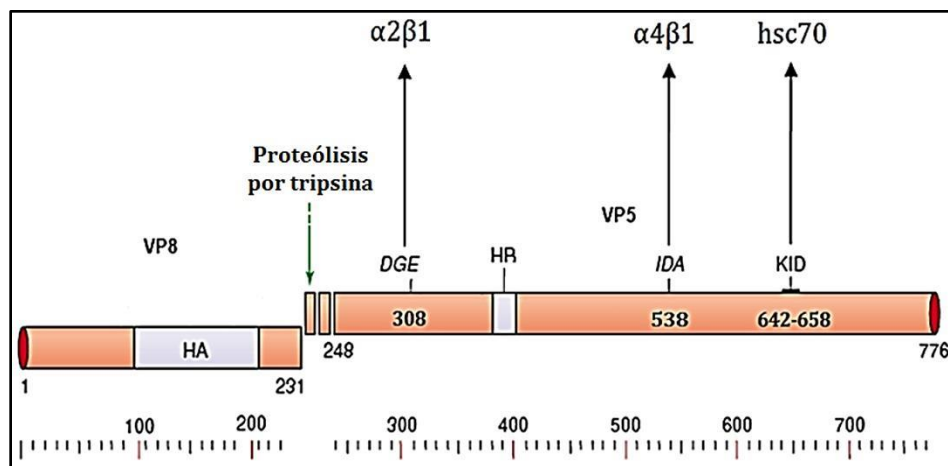


Figura 2. Esquema de la proteína VP4 y sus dominios característicos. La escala está basada en los aa que conforman a la proteína. HA, dominio de hemaglutinación; HR, región hidrofóbica. Se indican los tripéptidos de interacción con receptores celulares. La descripción se encuentra en el texto. Imagen tomada y modificada de la referencia [31].

La proteína VP8 de algunas cepas de rotavirus contiene un dominio de unión a ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico, SA) comprendido entre los aa 93 y 208 de la proteína, el cuál le confiere a VP4 y a estos rotavirus, la capacidad de aglutinar eritrocitos (Fig. 2) [32-34]. La infectividad de estos virus es inhibida por el tratamiento de las células con la enzima neuraminidasa (NA), la cual hidroliza los residuos de SA terminales presentes en moléculas de la superficie celular y, en consecuencia, estos rotavirus han sido denominados “NA-sensibles” [35]. Ejemplos de virus NA-sensibles son las cepas de rotavirus de simio RRV y SA11

[20, 36, 37]. En contraste, se han reportado cepas de rotavirus que son “NA-resistentes” [38, 39], y se demostró que el dominio VP8 de varias cepas de rotavirus NA-resistentes puede interactuar con SA subterminales, los cuales no son susceptibles de la hidrólisis ocasionada por la actividad de la NA y forman parte de moléculas de superficie celular como los gangliósidos [40-42]. Ejemplos de estos rotavirus son la cepa de origen bovino UK y el rotavirus humano Wa [39, 40].

Sin embargo, los SA terminales o sub-terminales no son los únicos carbohidratos que pueden ser reconocidos por la proteína VP8. Recientemente se demostró que cepas de rotavirus NA-resistentes de origen humano son capaces de reconocer y unir carbohidratos de los grupos sanguíneos mediante su proteína VP8 [15, 43-46]. Aunque cada vez existen más reportes de cepas humanas de diferentes genotipos P que reconocen este tipo de carbohidratos, aún se desconoce el papel preciso de la interacción con estos antígenos en el contexto de la infección por rotavirus.

Por otra parte, también se han identificado dos dominios en la proteína VP5 que permiten su interacción con la superficie celular: un dominio que interacciona directamente con la membrana celular y que involucra a los residuos 265-279 y otro dominio localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la región comprendida entre los aa 248-474 que está implicado en la permeabilización de membranas [47]. También se demostró que los residuos W394 y V391 son importantes en la actividad de permeabilización de VP5 ya que mutaciones en estas posiciones bloquean la permeabilización de membranas celulares [48, 49].

Adicionalmente, VP5 contiene el tripéptido DGE en la posición 308-310 [50], que está implicado en el reconocimiento de la integrina $\alpha 2\beta 1$ [51, 52], y una secuencia tripéptido IDA en la posición 538-540 que interacciona con la integrina $\alpha 4\beta 1$ [50, 53]. También contiene dos regiones implicadas en el reconocimiento e interacción con la proteína constitutiva de estrés térmico hsc70. Una de ellas, denominada “dominio KID” por contener a estos aminoácidos importantes para la interacción con esta proteína, está localizada entre los aminoácidos 642-658 de

VP5 [54]. La segunda región documentada se encuentra entre los residuos 531-554 [55].

VI.3. LA PROTEÍNA VP7

VP7 es una glicoproteína de 326 residuos de aminoácidos (Fig. 3) que se ensambla en trímeros para formar una capa uniforme sobre las DLPs [12]. Mediante estudios bioquímicos y funcionales se demostró que este ensamblaje es dependiente de calcio [56-58], y recientemente se describió la estructura tridimensional de esta proteína junto con los sitios de interacción con este catión [59].

También se demostró que el tratamiento de TLPs con agentes quelantes de calcio como el EDTA resulta en la pérdida de la capa externa de su cápside [60, 61]. Lo anterior genera DLPs que por sí solas no son capaces de ingresar a la célula y, por lo tanto, los viriones pierden su capacidad infecciosa.

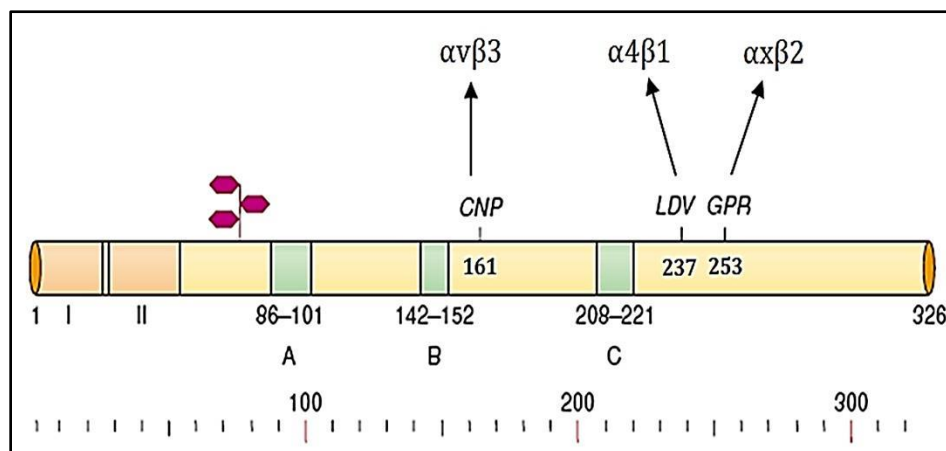


Figura 3. Esquema de la proteína VP7 y sus dominios característicos. La escala está basada en los aa que conforman a la proteína. El sitio de glicosilación se indica con la figura de hexágonos púrpuras. A, B y C indican las regiones más antigénicas de VP7. Los tripéptidos de interacción con receptores celulares son indicados y descritos en el texto. Imagen tomada y modificada de la referencia [31].

VP7 interacciona directamente con moléculas de superficie de la célula hospedera en un paso subsecuente al anclaje inicial del virus por su proteína VP4 [20]. Las proteínas VP7 de diferentes cepas de rotavirus contienen varios motivos

de unión a integrinas (Fig. 3): el tripéptido LDV en las posiciones de aminoácidos 237-239 para la integrina $\alpha 4\beta 1$ [50]; GPR en posiciones 253-255 para la integrina $\alpha x\beta 2$ [62], y un dominio de unión para la integrina $\alpha v\beta 3$, en las posiciones 161-169 que contiene el tripéptido CNP (consecuentemente denominado “dominio CNP”) [62, 63].

Varias de las propiedades y funciones de las proteínas VP7 y VP4 han sido descritas mediante el uso de virus rearreglantes.

VI.4. ROTAVIRUS REARREGLANTES

En el área de la virología, los estudios basados en el enfoque de genética reversa permiten poner a prueba hipótesis racionales y responder preguntas complejas acerca de la estructura de los viriones y de las interacciones virus-célula. Lo anterior se logra con la introducción de mutaciones puntuales dentro de los genomas virales para analizar sus productos codificantes y sus fenotipos. Lamentablemente para el caso específico de los rotavirus, no se ha podido desarrollar un sistema de genética reversa eficiente. Debido a esto, para estudiar las funciones de los diferentes genes de los rotavirus y sobrepasar la carencia de un sistema de genética reversa funcional, se ha empleado el uso de virus rearreglantes, los cuales se obtienen al co-infectar células con dos cepas de rotavirus diferentes [64]. La característica del genoma segmentado de los rotavirus da lugar a que pueda existir la segregación de uno o más segmentos de dsRNA de un virus progenitor junto con el resto de los segmentos de dsRNA del otro virus progenitor, creándose de esta manera virus que poseen segmentos de RNA de ambos virus progenitores.

El patrón electroforético del genoma segmentado de los rotavirus permite diferenciar una cepa de rotavirus de otra. Esta propiedad es utilizada para elegir el virus rearreglante de interés. Los rearreglantes han sido ampliamente usados como candidatos para identificar las funciones de los genes virales, ya que la segregación de un segmento proveniente de una de las cepas progenitoras junto con un fenotipo dado, demuestra que éste último se encontraba codificado en el segmento segregado [64].

El trabajo de Kalica et al. (1983) es un ejemplo de la aplicación de los rearreglantes. Mediante el uso de este enfoque se demostró que la capacidad del rotavirus RRV para aglutinar eritrocitos residía en la proteína de capa externa VP4. Para esto generaron rearreglantes al co-infectar esta cepa con otra cepa de rotavirus, la cepa bovina UK, que no presenta dicha actividad de hemaglutinación. Uno de los rearreglantes aislados poseía todos los segmentos de RNA derivados del genoma del rotavirus UK con excepción del segmento que codifica para VP4, que derivaba de la cepa RRV. Este rearreglante, a diferencia del virus progenitor UK, presentaba actividad de hemaglutinación [16].

VI.5. ENTRADA DE ROTAVIRUS A LA CÉLULA

Las primeras etapas de una infección viral consisten en el anclaje de las partículas virales a receptores celulares, seguido por la internalización del virus a la célula, la replicación del genoma viral y la síntesis de las proteínas, que darán origen a la progenie viral. Los receptores usados por los virus se clasifican generalmente en dos tipos: 1) receptores de unión, los cuales permiten que la partícula viral se ancle a la superficie celular y, 2) receptores de entrada ó co-receptores, los cuales se usan en pasos posteriores a la unión con la célula y promueven el ingreso del virus al interior de la célula [31].

In vivo, los rotavirus presentan un tropismo celular natural específico, infectando principalmente a los enterocitos de las puntas de las vellosidades intestinales. Sin embargo, se ha descrito que los rotavirus se pueden diseminar extra-intestinalmente, causando viremia [10]. *In vitro*, estos virus se unen esencialmente a la superficie de casi todas las líneas celulares probadas, e infectan de manera eficiente a líneas celulares derivadas de epitelio renal e intestinal [12].

López y Arias (2004) han propuesto un modelo de las interacciones tempranas del rotavirus de simio RRV en la línea celular derivada de epitelio renal de simio MA104 [31]. En este contexto, la entrada del virus requiere de varios pasos (Fig. 4), siendo el primero de estos la activación de la partícula viral con tripsina, como se mencionó anteriormente (Fig. 4-1). Las partículas activadas se

unen a la célula utilizando receptores presentes en la superficie celular. Debido a que las balsas lipídicas (lipids rafts) son importantes en la entrada de RRV, se ha propuesto que los receptores para este virus se encuentran en tales microdominios de la membrana celular.

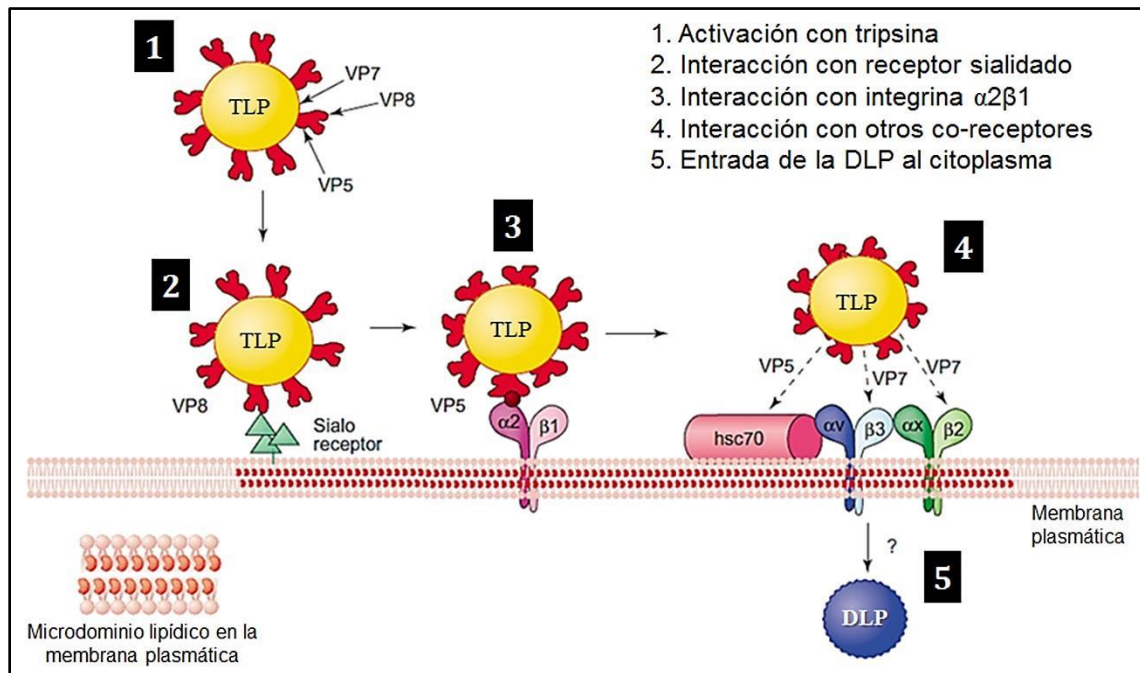


Figura 4. Modelo de las interacciones tempranas entre rotavirus y la célula huésped. El esquema muestra las interacciones del rotavirus RRV con sus diferentes receptores propuestos. Sialo receptor, receptores conteniendo ácidos siálicos (receptor sialidado); $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2$, diferentes integrinas; hsc70, proteína constitutiva de estrés calórico. La descripción se encuentra en el texto. Imagen tomada y modificada de la referencia [31].

Se propone que la interacción de RRV con la célula huésped se da por un proceso de pasos múltiples y secuenciales, dentro de los cuales, la interacción inicial se lleva a cabo entre el dominio VP8 de VP4 y un receptor celular conteniendo SA (Fig. 4-2). La interacción inicial del virus con el receptor que contiene el SA posiblemente induce un cambio conformacional en VP4 que permite la interacción subsecuente del motivo DGE presente en el dominio VP5 de esta proteína con el dominio I de la integrina $\alpha 2\beta 1$ (Fig. 4-3). Posterior a esta segunda interacción, ocurren tres más. Se propone que las primeras interacciones del virus con su célula huésped podrían promover cambios conformacionales en VP4 que facilitarían la interacción entre: 1) el dominio CNP de VP7 y la integrina

$\alpha\text{v}\beta 3$, 2) el tripéptido GRP de VP7 y la integrina $\alpha\text{x}\beta 2$ y, 3) el dominio KID de VP5 y el dominio de unión a ligando de la proteína hsc70 (Fig. 4-4), aunque se desconoce cuál es el orden en el que se llevan a cabo las mismas [31]. Posterior a las interacciones con receptores, el rotavirus se internaliza en la célula, pierde la capa proteica externa de su cápside y se piensa que posteriormente la DLP generada es liberada en el citoplasma (Fig. 4-5), lugar donde el virus continuará con el siguiente paso de su replicación.

Cabe mencionar que el modelo de interacciones tempranas de RRV con la línea celular MA104 no puede aplicarse de manera general a todos los rotavirus debido a que se ha observado que varias cepas de estos virus pueden reconocer otras moléculas de la superficie celular e incluso presentan requerimientos de receptores diferentes a los de RRV (Tabla 1). Por ejemplo, se ha descrito que existen cepas de rotavirus que aparentemente no requieren de integrinas para su infectividad [62], mientras que como se mencionó anteriormente, otras cepas pueden reconocer azúcares de antígenos sanguíneos como posibles receptores celulares [15, 43-46], e inclusive recientes datos provenientes de nuestro laboratorio sugieren que algunas moléculas de uniones estrechas son necesarias en las interacciones tempranas de varias cepas de rotavirus para infectar células MA104 (Torres-Flores J.; datos sin publicar).

Posterior al reconocimiento de receptores celulares por un virus, el siguiente paso es su internalización en la célula para poder llegar al citoplasma u organelo donde comenzará con su replicación. Para el caso de los rotavirus cada vez existe más evidencia experimental que indica que estos patógenos se internalizan en la célula huésped mediante procesos de endocitosis [2, 3, 65-67].

Tabla 1. Moléculas de la superficie celular reconocidas por las proteínas VP4 o VP7, y/o requeridas para la entrada celular de las cepas de rotavirus usadas en este estudio.

| Rotavirus (Genotipo P y G) | Origen | Moléculas de superficie | Requerimiento o reconocimiento | Referencias |
|---------------------------------------|---------------|---|---------------------------------------|-----------------------------|
| RRV (G3P[3]) | Simio | SA-terminales | Si | [34, 37-39, 68] |
| | | Gangliósidos ^A | Si | [69-72] |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos ^B | ND ^{C,D} | --- |
| | | Integrinas ^E | Si | [52, 53, 62, 73-80] |
| | | Hsc70 | Si | [2, 54, 55, 80-82] |
| | | PDI | Si | [80, 83] |
| Nar3 ^F (G3P[3]) | RRV | SA-terminales | Si | [37] |
| | | Gangliósidos | Si | [69] |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | ND ^{C,D} | --- |
| | | Integrinas | Si | [52, 73] |
| | | Hsc70 | Si | [54, 81] |
| | | PDI | ND ^C | --- |
| SA11 (G3P[2]) | Simio | SA-terminales | Si | [38, 39] |
| | | Gangliósidos | Si | [40, 84-86] |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | ND ^{C,D} | --- |
| | | Integrinas | Si | [50, 51, 53, 62, 76, 87] |
| | | Hsc70 | ND ^C | --- |
| | | PDI | ND ^C | --- |
| UK (G6P[5]) | Bovino | SA-terminales | No | [38, 40] |
| | | Gangliósidos | Si | [40, 72, 88] |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | ND ^{C,D} | --- |
| | | Integrinas | Si | [78] |
| | | Hsc70 | Si | [2] |
| | | PDI | ND ^C | --- |
| Wa (G1P[8]) | Humano | SA-terminales | No | [39] |
| | | Gangliósidos | Si | [42, 72, 88] |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | Si | [44] |
| | | Integrinas | Si | [53, 62, 73, 76-80, 87, 88] |
| | | Hsc70 | Si | [2, 55, 80, 81] |
| | | PDI | Si | [80] |

| | | | | |
|------------------|---------|--------------------------------|-------------------|----------|
| WI61 (G9P[8]) | Humano | SA-terminales | No | [39] |
| | | Gangliósidos | ND ^c | --- |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | ND ^{c,g} | --- |
| | | Integrinas | ND ^c | --- |
| | | Hsc70 | ND ^c | --- |
| | | PDI | ND ^c | --- |
| DS-1 (G2P[4]) | Humano | SA-terminales | No | [39] |
| | | Gangliósidos | Si | [84] |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | Si | [44] |
| | | Integrinas | ND ^c | --- |
| | | Hsc70 | ND ^c | --- |
| | | PDI | ND ^c | --- |
| YM (G11P[7]) | Porcino | SA-terminales | Si | [38, 89] |
| | | Gangliósidos | ND ^c | |
| | | Antígenos de grupos sanguíneos | ND ^{c,d} | --- |
| | | Integrinas | ND ^c | --- |
| | | Hsc70 | ND ^c | --- |
| | | PDI | ND ^c | --- |

^ALos gangliósidos implicados en este rubro contienen SA-terminales o sub-terminales. En las referencias indicadas se encuentra el detalle de estos.

^BLos antígenos de grupos sanguíneos humanos evaluados para esta cepa fueron los antígenos tipo H y de Lewis Le^b.

^CND indica que no ha sido determinada la interacción de la molécula de superficie indicada con alguna proteína de rotavirus, así como el requerimiento de la misma en la entrada celular del virus.

^DUn estudio filogenético de varias secuencias de VP8 a nivel de nucleótidos sugiere que es poco probable que esta cepa de rotavirus pudiera reconocer antígenos de grupos sanguíneos humanos [15].

^EEl reconocimiento o requerimiento de estas moléculas de superficie con la cepa de rotavirus indicada puede incluir a dos o más de las siguientes integrinas: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, o las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 3$ y $\beta 2$ de las mismas. El dato preciso se encuentra en las referencias indicadas.

^FNar3 es un rotavirus variante (mutante) de RRV cuya infectividad es resistente al tratamiento de las células con NA [37].

^GDebido al genotipo [P] de este rotavirus, es probable que esta cepa pudiera reconocer los mismos antígenos de grupos sanguíneos humanos que la cepa de rotavirus Wa [15].

VI.6. ENDOCITOSIS

La endocitosis es un proceso que le permite a la célula introducir macromoléculas y partículas (definidas en general como “cargamentos”) transportadas dentro de vesículas derivadas de la membrana plasmática. Existen diferentes mecanismos de endocitosis y se ha propuesto un sistema de

clasificación para éstos, basado en algunas de las proteínas que intervienen en ellas (Fig. 5).

Cualquiera de las rutas endocíticas que se lleve a cabo para el transporte de algún cargamento específico tiene tres pasos elementales. El primero consiste en tener un mecanismo para seleccionar el cargamento (ie. endocitosis mediada por receptor); el segundo paso consiste en que un fragmento de la membrana plasmática deberá de formar una vesícula conteniendo el cargamento previamente seleccionado y gemar hacia el interior de la célula, y por último, el tercer paso consiste en que la vesícula se dirigirá a diferentes organelos [90].

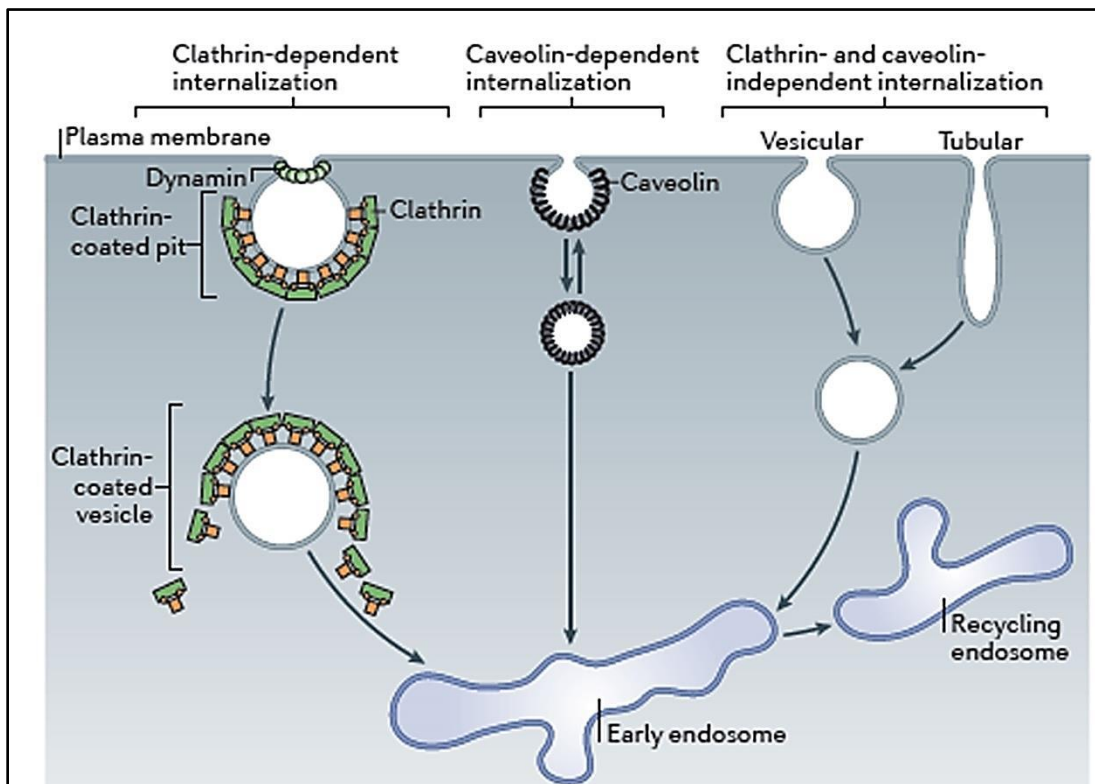


Figura 5. Esquema de los principales mecanismos de endocitosis. Se esquematizan la endocitosis mediada por clatrina (Clathrin-dependent internalization), endocitosis mediada por caveolas (caveolin-dependent internalization) y la endocitosis independiente de clatrina y caveolas (Clathrin- and caveolin-independent internalization). Imagen tomada de la referencia [91].

VI.6.1. ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA

Este tipo de endocitosis es el mejor caracterizado de todos los descritos y requiere de varios componentes estructurales para que se puedan formar las

vesículas e internalizarse en la célula [91]. La clatrina, uno de estos componentes, está formada de tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras de proteínas que dan lugar a una unidad conocida como el trípode. Este complejo es reclutado al sitio de la membrana plasmática donde ocurrirá la endocitosis, a través de complejos de proteínas adaptadoras (AP). Un ejemplo de estos es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β , μ 2 y σ 2), y que se une a las proteínas integrales de membrana de su lado citosólico, determinando qué carga de proteínas, así como las moléculas unidas a éstas, serán específicamente incluidas en la vesícula que se formará. El complejo AP-2, además de promover el ensamble de la cubierta de clatrina, sirve como plataforma que provee sitios de interacción para varias otras proteínas. Un ejemplo de estas proteínas es Eps15, que se asocia de forma constitutiva a AP-2. Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta tomar la forma de una vesícula endocítica que tiene un tamaño aproximado de 100 nm de diámetro. La vesícula es liberada de la membrana celular por la acción de la GTPasa dinamina para después perder su cubierta de clatrina por la acción de la proteína constitutiva de choque térmico hsc70, la cual tiene actividad de ATPasa. Posteriormente, la vesícula endocítica se puede fusionar a un endosoma temprano (Fig. 5) [91].

Ejemplos de virus que se internalizan en la célula huésped por endocitosis mediada por clatrina son los virus de la influenza, Ébola, papilomavirus, adenovirus, SARS-coronavirus y reovirus [92].

VI.6.2. ENDOCITOSIS INDEPENDIENTE DE CLATRINA (EIC)

Se ha propuesto que la endocitosis independiente de clatrina (EIC) se puede clasificar en base al requerimiento de la GTPasa dinamina [90]. Dentro de esta clasificación se encuentran los mecanismos de endocitosis dependiente e independiente de caveolina, y el dependiente de la GTPasa RhoA, los cuales se revisan brevemente a continuación.

VI.6.2.1. EIC DEPENDIENTE DE DINAMINA Y CAVEOLINA

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana celular que se encuentran asociadas a balsas lipídicas y que forman parte de vesículas endocíticas que miden de 60 a 80 nm de diámetro llamadas caveolas. Se han identificado 3 caveolinas: las caveolinas 1 (CAV1) y 2 (CAV2) son abundantes en células no musculares, mientras que la CAV3 está presente tanto en células de músculo estriado como de músculo liso [93]. Las caveolas formadas conteniendo sus moléculas “cargamento” son liberadas dentro de la célula por la acción de la dinamina para posteriormente fusionarse con los endosomas tempranos [93].

La endocitosis mediada por caveolas es utilizada por algunos virus pequeños para poder entrar a la célula hospedera. Tal es el caso de los poliomavirus PyV, BKV y SV40 [93, 94].

VI.6.2.2 EIC DEPENDIENTE DE DINAMINA Y RhoA

Mediante esta vía endocítica se lleva a cabo la internalización de la cadena β del receptor de interleucina 2. Se caracteriza por la independencia de clatrina y caveolina, pero depende de dinamina y de la pequeña GTPasa RhoA. Ya que RhoA es una molécula clave en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, se cree que ésta podría reclutar la maquinaria de actina para regular la endocitosis por esta vía [90]. Aún se conoce poco acerca de este tipo de endocitosis.

VI.6.2.3. EIC INDEPENDIENTE DE DINAMINA

Las rutas endocíticas de este tipo presentan la característica de no depender de clatrina, caveolina o dinamina, además de utilizar a las pequeñas GTPasas CDC42 o ARF6, pertenecientes a las familias de GTPasas Rho y Arf, respectivamente. Mediante la endocitosis dependiente de CDC42 se internalizan toxinas como la toxina B de cólera (CtxB), la toxina VacA de *Helicobacter pylori* y proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI-AP), aunque estas últimas también son internalizadas en la célula mediante endocitosis mediada por caveolas. Las GPI-AP son transportadas en estructuras llamadas acarreadores

independientes de clatrina y dinamina (CLICs, siglas provenientes de “clathrin and dynamin independent carriers”) hacia estructuras conocidas como compartimentos endosomales tempranos enriquecidos en GPI-AP (GEECs de sus siglas en inglés) para posteriormente fusionarse a endosomas tempranos [90].

Aunque se desconoce el papel exacto de la GTPasa ARF6 en este tipo de endocitosis, se sabe que está implicada en la internalización de varias moléculas como la integrina $\beta 1$, el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) y GPI-APs [90].

VI.6.3. FAGOCITOSIS Y MACROPINOCITOSIS

Aunque estos mecanismos de endocitosis se caracterizan por ser dependientes del citoesqueleto de actina y por internalizar grandes regiones de la membrana celular (mayores a 1 μm), cada uno de ellos tiene funciones diferentes.

La fagocitosis es un tipo de mecanismo endocítico que es llevado a cabo por células especializadas, los fagocitos, cuya función principal es internalizar partículas relativamente grandes, tales como bacterias [90].

Por otra parte, la macropinocitosis es un mecanismo endocítico que se caracterizan por internalizar de manera no específica grandes cantidades de fluido extracelular, solutos, factores de crecimiento e inclusive partículas en respuesta a la activación de receptores en la membrana celular [90, 95].

Varias especies de bacterias y virus se internalizan en la célula hospedera mediante fagocitosis o macropinocitosis [95, 96], sin embargo no se profundizará más en sus características debido a que los rotavirus no se internalizan en la célula mediante ninguna de estas dos vías endocíticas [2].

VI.7. TRÁFICO VESICULAR

El tráfico vesicular juega un papel importante en la formación y el mantenimiento de diferentes compartimentos intracelulares y organelos, así como en la comunicación entre las células y el ambiente extracelular [97].

Una vez que las moléculas y partículas, incluyendo a los virus, han sido internalizadas en la célula por los diferentes mecanismos de endocitosis descritos

en la sección anterior, éstas son dirigidas hacia los endosomas tempranos. En el caso de los virus, estos patógenos aprovechan el tráfico vesicular de la célula y viajan a través de diferentes compartimentos vesiculares hasta llegar a aquél que posee las características y el ambiente adecuado para poder continuar con el siguiente paso de su ciclo de replicación.

Una de las maneras de estudiar el tráfico vesicular de moléculas cargo internalizadas en la célula es emplear enfoques genéticos, como la sobreexpresión de mutantes dominantes negativas o mediante el silenciamiento de la expresión de genes por RNAi. Usualmente se tienen como blancos proteínas que regulan la maduración de compartimentos endosomales, lo cual impacta directamente en detener o redireccionar el tráfico de moléculas modelo y en alterar la fisiología y función de los organelos endocíticos. A través de estas estrategias experimentales se ha estudiado el papel de proteínas regulatorias de diferentes etapas del tráfico vesicular, como son las pequeñas GTPasas Rab5, 7 y 9, y el antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA1). Estas proteínas también son de utilidad como marcadores celulares para identificar los diferentes organelos implicados en el tráfico vesicular, los cuales conforme van madurando sufren cambios morfológicos y pierden o adquieren nuevos marcadores, mientras que en el ambiente interno de los compartimentos endosomales también ocurren cambios de pH, de iones y de factores celulares. Ejemplo de estos marcadores celulares son la GTPasa pequeña Rab5 y su proteína efectora EEA1, las cuales están implicadas en dirigir las vesículas provenientes de la membrana plasmática hacia endosomas tempranos (EE, de sus siglas en inglés) y también en regular la fusión homotípica entre este tipo de endosomas [98].

Se piensa que los endosomas tempranos o parte de ellos posteriormente adquieren la GTPasa Rab7, la cual está involucrada en la formación de endosomas tardíos (LE, de sus siglas en inglés) y en la transferencia de moléculas que se encuentran dentro de estos organelos hacia los lisosomas [99].

Cabe mencionar que los endosomas tempranos no contienen a la proteína Rab7, por lo que esta GTPasa no es marcadora de dichos organelos. Sin embargo, Rab7 se encuentra en una clase de endosomas que también contienen

a Rab5, los cuales se creen que son organelos intermedios entre la transición o maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos. A esta clase de endosomas se les ha denominado endosomas en maduración (ME) **[100]**. Estos ME presentan algunas vesículas intraluminales, cuya formación está regulada por proteínas del complejo ESCRT (siglas de “endosomal sorting complex required for transport”) **[101]**.

Por su parte, la GTPasa pequeña Rab9 está involucrada en el tráfico vesicular retrógrado que va dirigido de endosomas tardíos hacia la red trans del aparato de Golgi (TGN, por sus siglas en inglés) **[102, 103]**. Además de ser usada como otro marcador de endosomas tardíos, Rab9 también tiene un papel importante en el mantenimiento y tamaño de estos organelos y en la biogénesis y localización intracelular de los lisosomas **[104, 105]**.

Adicionalmente a las GTPasas pequeñas que regulan el tráfico vesicular, otras proteínas como los receptores de manosa-6-fosfato (M6PRs) están involucradas en transportar factores celulares, como hidrolasas, desde el TGN hacia endosomas tardíos, lo cual es importante para una adecuada maduración de endosomas tardíos y lisosomas **[106]**. Hasta la fecha han sido identificados dos M6PRs, uno que depende de cationes para unir a sus ligandos (“cación dependiente”, CD-M6PR), y otro que no depende de cationes para llevar a cabo su función (“cación independiente”, CI-M6PR). A diferencia del CD-M6PR, cuya única función identificada ha sido el transporte de factores celulares de TGN hacia endosomas tardíos, el CI-M6PR está involucrado además en la endocitosis de diversas moléculas, por ejemplo el precursor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) **[106-108]**.

Además de que patógenos como los virus aprovechan el tráfico vesicular y los diferentes compartimentos endosomales para evadir la respuesta antiviral de la célula huésped, también explotan las propiedades de los diferentes tipos de endosomas para facilitar su ingreso hacia el citoplasma. Debido a que se han reportado virus que penetran en el citoplasma tanto a partir de compartimentos endosomales tempranos como tardíos, se ha propuesto una clasificación en la cual se les ha denominado “virus de penetración temprana” a los primeros,

mientras que los últimos se han clasificado como “virus de penetración tardía”
[109].

VII. ANTECEDENTES

Los datos generados en nuestro laboratorio indican que diferentes cepas de rotavirus pueden entrar a la célula huésped mediante diferentes vías de endocitosis [2, 3].

Mediante el uso de drogas que inhiben la endocitosis mediada por clatrina, y con el uso de mutantes dominantes negativas de las proteínas caveolina-1 y -3, de la proteína Eps15, y de la pequeña GTPasa dinamina II, Sánchez-San Martín et al. (2004) observaron que la infectividad de la cepa de rotavirus RRV (NA-sensible; integrinas-dependiente) no depende de caveolina, de Eps15, ni de clatrina, pero sí de dinamina II [3]. Por el contrario, usando el mismo enfoque experimental se observó que la infectividad de la cepa bovina de rotavirus UK (NA-resistente; integrinas-independiente) depende de Eps15 [110].

Recientemente, Gutiérrez et al. (2010), reportaron que los tiempos de entrada en células MA104 de varias cepas de rotavirus difieren entre sí. Al realizar ensayos de cinéticas de entrada, los autores observaron que el tiempo promedio de entrada del rotavirus RRV en las células fue de 35 minutos, mientras que sólo el 20% del rotavirus UK pudo entrar en las células después de 90 minutos. Los autores también demostraron, mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi), que la infectividad de la cepa de rotavirus de simio RRV no depende de clatrina ni de caveolina, mientras que la infectividad de las cepas de rotavirus de origen bovino, humano y porcino, UK, Wa y TFR-41, respectivamente, es dependiente de clatrina. Además, mediante el uso de dominantes negativas se demostró que la infectividad de todas las cepas mencionadas depende de dinamina II [2].

Mediante el uso de agentes lisosomotrópicos que alteran el pH endosomal, se observó que la infectividad de los rotavirus RRV y UK es diferente entre sí. La infectividad del rotavirus UK disminuye al tratar a las células con NH_4Cl , mientras que la infectividad de la cepa RRV no se afecta por la misma condición [2].

Por otra parte, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que el tráfico vesicular que sigue a la endocitosis de RRV y UK depende

de Rab5 y EEA1, ya que la infectividad de ambas cepas de rotavirus disminuyó drásticamente al silenciar la expresión de estas proteínas mediante RNAi [111].

De interés, recientemente se describió que, en ensayos de entrada en células polarizadas MDCK-II y en la línea celular MA104, proteínas de la cápside del rotavirus RRV co-localizan con Rab5, marcador de endosomas tempranos, pero no con Rab7, GTPasa marcadora de endosomas tardíos [67, 112]. También se observó mediante el uso de mutantes dominantes negativas que la infectividad de ambas cepas de rotavirus depende de Rab5, mientras que para el caso de RRV es independiente de Rab7. Cabe mencionar que el papel de Rab7 en la infectividad de UK no fue evaluado por estos investigadores [112].

Datos recientemente publicados apoyaron los reportes anteriores demostrando, mediante un enfoque de RNAi, que la cepa de rotavirus RRV requiere de las proteínas Rab5 y EEA1 para entrar en células MA104 pero no de la GTPasa Rab7 [4]. En el mismo estudio se demostró que las GTPasas CDC42 y RhoA, así como proteínas del complejo ESCRT también están involucradas en la entrada de RRV a la célula. También se observó que el proceso de entrada en la célula de la cepa de rotavirus UK depende de la expresión de la GTPasa Rab7 y del CD-M6PR, y que la infectividad de esta cepa bovina de rotavirus también depende de proteínas del complejo ESCRT [5], al igual que la de los rotavirus humanos Wa y DS-1 [4].

Todos estos datos en conjunto indican que los rotavirus RRV y UK ingresan a la célula mediante mecanismos de endocitosis diferentes. Para el caso de RRV, el ingreso a la célula hospedera es mediado por un mecanismo de endocitosis atípica que es independiente de clatrina y caveolina, pero dependiente de dinamina II. En contraste, la entrada de los rotavirus UK, Wa y TFR-41 en la célula huésped tampoco depende de caveolina, pero sí de la presencia de las proteínas clatrina, Eps15 y dinamina II, sugiriendo que estos virus se internalizan en las células MA104 por un mecanismo clásico de endocitosis mediada por clatrina. Además, aunque existe poca información respecto al tráfico vesicular de los rotavirus, los datos disponibles sugieren que el rotavirus UK transita por compartimentos endosomales tempranos posterior a su internalización en la célula

mediante endocitosis dependiente de clatrina y llega a endosomas tardíos. Por su parte, el tráfico vesicular que sigue a la internalización de RRV termina en ME, al igual que los rotavirus humanos Wa y DS-1.

Debido a que las proteínas de capa externa VP4 y VP7 están involucradas en las interacciones iniciales del virus con la célula huésped, existe la posibilidad de que éstas pudieran estar implicadas en dirigir al virus a través de las vías de endocitosis sugeridas, sin embargo no se cuenta con información al respecto.

VIII. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos por los cuáles los virus no envueltos, es decir, que no contienen una bicapa lipídica en su exterior, logran entrar a su célula huésped aún son poco comprendidos [92]. Para el caso de los rotavirus, se han comenzado a describir los mecanismos de endocitosis que utilizan para internalizarse en la célula [2-4, 67, 112]. Los datos generados en nuestro laboratorio sugieren que diferentes cepas de rotavirus pueden entrar por vías endocíticas diferentes en células epiteliales de riñón de mono MA104, tal y como se describió anteriormente para las cepas de rotavirus RRV y UK.

Debido a que: 1) diferentes cepas de rotavirus presentan algunas diferencias en los requerimientos de receptores celulares, 2) las proteínas VP4 y VP7 presentan dominios de unión a estos receptores y, 3) muchos de los procesos de endocitosis que se presentan en la célula son originados por la unión de un ligando a un receptor (endocitosis mediada por receptor) [90, 113], es muy probable que el tipo de endocitosis empleado por las cepas de rotavirus RRV y UK sea mediado por la interacción de las proteínas de la capa externa de su cápside con receptores celulares.

En ese sentido, la estrategia de utilizar virus rearreglantes que contengan las proteínas VP4 y VP7 provenientes de estas diferentes cepas de rotavirus podría sugerir cuál o cuáles son las proteínas de cápside implicadas en dirigir su entrada mediante una u otra vía de endocitosis. Lo anterior permitiría profundizar en la caracterización de los mecanismos de endocitosis y tráfico vesicular de diferentes cepas de rotavirus, lo cual contribuiría al entendimiento de los mecanismos de entrada de estos patógenos, haciendo aportaciones directas en las áreas del conocimiento de la virología y de la biología celular.

IX. HIPÓTESIS

Las proteínas VP4 y/o VP7 de la cápside de los rotavirus son responsables de direccionar la entrada de los rotavirus en células MA104 mediante diferentes mecanismos de endocitosis.

X. OBJETIVOS

X.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los factores virales (proteínas de cápside) implicados en direccionar los mecanismos de endocitosis asociados a la entrada de los rotavirus en células MA104, y profundizar en la caracterización de su tráfico vesicular.

X.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar cuál o cuáles proteínas de la cápside del rotavirus UK están implicadas en la endocitosis mediada por clatrina en células MA104.
2. Identificar cuál o cuáles proteínas de la cápside del rotavirus RRV están implicadas en su endocitosis en células MA104.
3. Estudiar los dominios de la(s) proteína(s) virales que resulten implicadas en los mecanismos de endocitosis en células MA104.
4. Determinar si el tráfico vesicular de los rotavirus RRV y UK está relacionado con alguna de sus proteínas de cápside.
5. Caracterizar la vía de entrada en células MA104 de cepas de rotavirus que poseen genotipos "P", "G", y requerimientos de receptores celulares diferentes a los de RRV y UK.

XI. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y cepas de virus. La línea celular MA104 (ATCC), derivada de células embrionarias de riñón de mono verde africano (*Cholorocebus aethiops*) fue cultivada utilizando el medio MEM (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ a 37 °C. La línea celular L929 (ATCC) fue propagada usando las mismas condiciones ambientales y el mismo medio de cultivo pero suplementado con 10% de SFB. Las cepas de rotavirus RRV (G3P[3]), UK (G6P[5]), y los rotavirus rearreglantes UKxRRV (Tabla 2) fueron amablemente donados por Y. Hoshino (NIAID-NIH, Bethesda, MD) [114]. El rotavirus variante de RRV, Nar3, y sus revertantes clonas 14 y 18 (rNar3-14 and rNar3-18) fueron generadas en nuestro laboratorio [37, 115]. Las cepas de rotavirus humano Wa (G1P[8]) y DS-1 (G2P[4]) fueron obtenidas de H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford CA), y el rotavirus humano WI61 (G9P[8]) fue donada por F. H. Clark (Wistar Institute, Philadelphia PA; a través de M. K. Estes). La cepa de rotavirus de simio SA11-4S (clone 3) (G3P[2]) fue obtenida de M. K. Estes (Baylor College of Medicine, Houston Texas), y la cepa de rotavirus porcino YM (G11P[7]) fue aislada en nuestro laboratorio [116]. Todas las cepas de rotavirus fueron propagadas en células MA104 como se describió previamente [117]. Las cepas de rotavirus fueron activadas con tripsina (10 µg/ml) durante 30 min a 37°C. Las TLPs y DLPs de las cepas RRV y UK fueron purificadas por gradientes isopícnicos de CsCl [117]. Los reovirus de mamífero tipo 1 cepa Lang (ReoT1) y tipo 3 cepa Dearing (ReoT3) fueron amablemente donados por T. S. Dermody (Vanderbilt University, Nashville TN). Ambos reovirus fueron propagados en la línea celular L929 y el título viral fue determinado en células MA104 como se describió previamente [2, 118].

Anticuerpos y reactivos. El anticuerpo monoclonal para detectar la cadena pesada de clatrina (CHC) fue de la marca Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Los anticuerpos monoclonales para detectar las proteínas Rab5a and Rab7a, así

como el anticuerpo policlonal para detectar catepsina L fueron de Abcam (Cambridge, MA). El anticuerpo monoclonal usado para la detección de Rab9a fue comprado a GeneTex, Inc. (Irvine, CA). Los anticuerpos policlonales para la detección de las catepsinas B y S fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, Texas). Los sueros hiper-inmunes de conejo para la detección de antígeno viral de rotavirus (α -TLPs), reovirus (α -Reo) y de la proteína de citoesqueleto vimentina (α -Vim), fueron producidos en nuestro laboratorio. Los anticuerpos policlonales de cabra acoplados a peroxidasa para detectar anticuerpos de conejo y de ratón (α -conejo y α -ratón peroxidasa respectivamente) fueron de la marca Perkin Elmer Life Sciences (Waltham, MA). La sacarosa, el EGTA, la neuraminidasa (NA) de *Arthrobacter ureafaciens*, la glicoforina A (GphA), el inhibidor de catepsina B (CA-074), y el kit para la detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), fueron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). La tripsina fue comprada de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). El inhibidor de catepsina L (Z-FF-FMK) y el dimetil sulfóxido (DMSO) fueron de Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt, Germany), mientras que la leupeptina fue obtenida de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN). Los siRNAs fueron de Dharmacon-Thermo Scientific (Pittsburg, PA).

Tratamientos celulares. La transfección de siRNAs en células MA104 se llevó a cabo en cajas 96 pozos usando un método de transfección reversa [2]. Para el tratamiento de las células con sacarosa, monocapas confluentes de células MA104 cultivadas en cajas de 96 pozos fueron lavadas dos veces con MEM y pre-tratadas con sacarosa 250 mM [2]. Para el tratamiento de las células con NA, monocapas confluentes de células MA104 fueron cultivadas en cajas de 96 pozos y pre-tratadas con 80 mU/ml de NA de *A. ureafaciens* como se describió previamente [37]. Para los ensayos con inhibidores de proteasas, monocapas confluentes de células MA104 fueron pre-tratadas con leupeptina 25 μ M (disuelta agua), o con una concentración de 5 μ M de los inhibidores de catepsina B o L (disueltos en DMSO) durante 1 h a 37°C. Como controles las células fueron tratadas sólo con los solventes de las proteasas. Ninguno de los tratamientos

celulares empleados fue citotóxico según ensayos de determinación de la liberación de LDH usando un kit comercial (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO).

Ensayos de infectividad. Monocapas confluentes de células MA104 fueron lavadas dos veces con MEM y posteriormente inoculadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.02 usando lisados celulares de los virus indicados. Transcurrida una hora de adsorción del virus, el inóculo fue retirado, las células lavadas dos veces con MEM e incubadas por 14 o 16 horas (h) en ensayos con rotavirus o reovirus respectivamente. Posteriormente las monocapas de células fueron fijadas con acetona al 80% en buffer de fosfatos (PBS) y la visualización de unidades formadoras de focos infecciosos (uff), fue determinada por un ensayo de inmunoperoxidasa descrito previamente [17]. En ensayos de infectividad en células tratadas con sacarosa, después del periodo de adsorción y antes de lavar la monocapa dos veces con MEM, las células fueron lavadas dos veces con EGTA-PBS [2]. Para los ensayos de infectividad combinando los enfoques de RNAi y NA o GphA, células transfectadas con los siRNAs indicados fueron tratadas con NA y posteriormente infectadas con lisados virales previamente incubados o no con una concentración final 10 µg/ml de GphA durante 30 minutos como se describió previamente [37]. Para los ensayos con inhibidores de proteasas, los virus indicados fueron inoculados con una MOI de 0.02 en presencia del inhibidor indicado y después de 1 h de adsorción a 37°C el inóculo fue retirado y las células fueron lavadas 2 veces para posteriormente agregar MEM fresco con el inhibidor de proteasas respectivo. Después de 14 o 16 h de incubación para células inoculadas con rotavirus o reovirus respectivamente, las monocapas de MA104 fueron fijadas con acetona y tratadas como se indica arriba para cuantificar la infectividad de los virus indicados. Los inhibidores de proteasas se mantuvieron durante todo el transcurso del ensayo de infectividad.

Lipofección de DLPs. La lipofección de DLPs de diferentes cepas de rotavirus se realizó como se ha descrito previamente [2], y la detección de uff se realizó como se indica en los ensayos de infectividad (ver arriba).

Ensayos de unión del virus a la célula. Monocapas de células MA104 fueron cultivadas y transfectadas con los siRNAs indicados en cajas de 96 pozos y posteriormente tratadas o no con NA como se describe arriba. Después de dos lavados con MEM, la unión de las cepas indicadas de rotavirus sobre las monocapas tratadas se ensayó como se describió previamente [63].

Inmunoblots. Monocapas de células MA104 fueron lisadas con buffer de Laemmli y posteriormente desnaturalizadas mediante calor (100°C) durante 5 minutos (min). Los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con 10% de SDS (10% SDS-PAGE) y sus proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Immobilon NC). Las membranas fueron procesadas para detectar las proteínas indicadas en cada caso, de acuerdo a condiciones descritas previamente [2, 111].

Ensayos de RT-PCR cuantitativo. La eficiencia del silenciamiento de la expresión del gen de CD-M6PR a nivel de mRNA fue determinada mediante RT-PCR cuantitativo [5].

Análisis estadístico. Los resultados experimentales fueron evaluados con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey) usando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados experimentales cuyos valores de “*p*”, obtenidos en las pruebas estadísticas, fueron menores a 0.05.

XII. RESULTADOS

XII. 1. Identificación de las proteínas virales implicadas en la endocitosis mediada por clatrina del rotavirus UK

Previamente se demostró que los tratamientos celulares que inhiben la endocitosis mediada por clatrina provocan una disminución en la infectividad del rotavirus bovino UK pero no del rotavirus RRV [2, 3]. Con el objetivo de identificar las proteínas de cápside asociadas con la ruta endocítica observada para el rotavirus UK, se utilizó una colección de virus rearreglantes que contienen diferentes combinaciones de proteínas de cápside provenientes de estas cepas de rotavirus (Tabla 2), y se evaluó su sensibilidad a tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina.

Tabla 2. Proteínas de cápside presentes en los virus rearreglantes (rearreglantes UKxRRV) y en los rotavirus progenitores RRV y UK.

| Virus | VP1 | VP3 | VP2 | VP6 | VP7 | VP4 |
|-------------------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| UK^a | U ^b | U | U | U | U | U |
| RRV^a | R ^c | R | R | R | R | R |
| 9 (9-8-1) ^d | U | U | U | U | R | U |
| 13 (13-1-1) | R | R | R | U | R | R |
| 19 (19-1-1) | R | R | R | R | R | U |
| 20 (20-1-1) | U | U | R | R | U | U |
| 21 (21-1-1) | U | U | U | R | U | U |
| 25 (25-2-1) | R | R | R | U | R | R |
| 27 (27-2-1) | R | R | R | U | R | R |
| 85 (85-2) | U | R | R | R | U | R |

^aCepas de rotavirus a partir de las cuales se generaron los rearreglantes.

^bU= Proteína codificada por el gen correspondiente del rotavirus bovino UK.

^cR= Proteína codificada por el gen correspondiente del rotavirus de simio RRV.

^dEntre los paréntesis se encuentra el nombre original reportado para cada virus rearreglante [114, 119].

El primer enfoque experimental que se usó fue evaluar la infectividad de los rotavirus rearreglantes en células tratadas con sacarosa. El tratamiento de las células con medio hipertónico (250 mM de sacarosa) resulta en la disociación de

las vesículas de clatrina de la membrana plasmática, disminuyendo la endocitosis de moléculas que se internalizan en la célula mediante esta vía [120, 121].

Como previamente se describió [2], el tratamiento con sacarosa disminuyó en alrededor del 40% la infectividad del rotavirus bovino UK respecto a la condición control de células sin dicho tratamiento, mientras que la infectividad de la cepa RRV no se afectó por el tratamiento hipertónico (Fig. 6A). Interesantemente, la infectividad de los virus rearreglantes que contienen la proteína VP4 proveniente de la cepa UK en su cápside (rearreglantes 9, 19, 20 y 21) también disminuyó alrededor del 40%, mientras que la infectividad de los rearreglantes que contienen la proteína VP4 proveniente de la cepa RRV (rearreglantes 13, 25, 27 y 85) no se afectó por el tratamiento con sacarosa (Fig. 6A).

Para confirmar estos resultados, la infectividad de los rearreglantes fue evaluada en células MA104 cuya expresión de la cadena pesada de clatrina (CHC) fue silenciada mediante la técnica de RNAi (Fig. 6B). En estas condiciones, la infectividad del rotavirus UK disminuyó cerca del 75% en células transfectadas con el siRNA dirigido contra la expresión de CHC, en comparación con la obtenida en células transfectadas con un siRNA irrelevante, mientras que la de RRV no se afectó (Fig. 6C), tal como se había reportado previamente [2]. La infectividad de los rearreglantes conteniendo la proteína VP4 de origen bovino (rearreglantes 9, 19, 20 y 21) disminuyó significativamente en células cuya expresión de CHC fue silenciada respecto a la condición control, mientras que la infectividad de los rearreglantes 13, 25, 27 y 85, que contienen la proteína VP4 proveniente de la cepa RRV, no se afectó en las mismas condiciones. Es importante resaltar que la infectividad del rearreglante 19, que contiene a la proteína VP4 de UK en su cápside y el resto de proteínas de cápside provienen de la cepa RRV, disminuyó con los tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina, lo cual sugiere sólidamente que los virus conteniendo la proteína VP4 derivada de la cepa UK se internalizan en la célula por endocitosis mediada por clatrina (Fig. 6A y 6C). Aunque no se contó con algún rearreglante que tuviera en su cápside a la proteína VP4 de RRV y el resto de las proteínas estructurales de UK, el hecho de que la

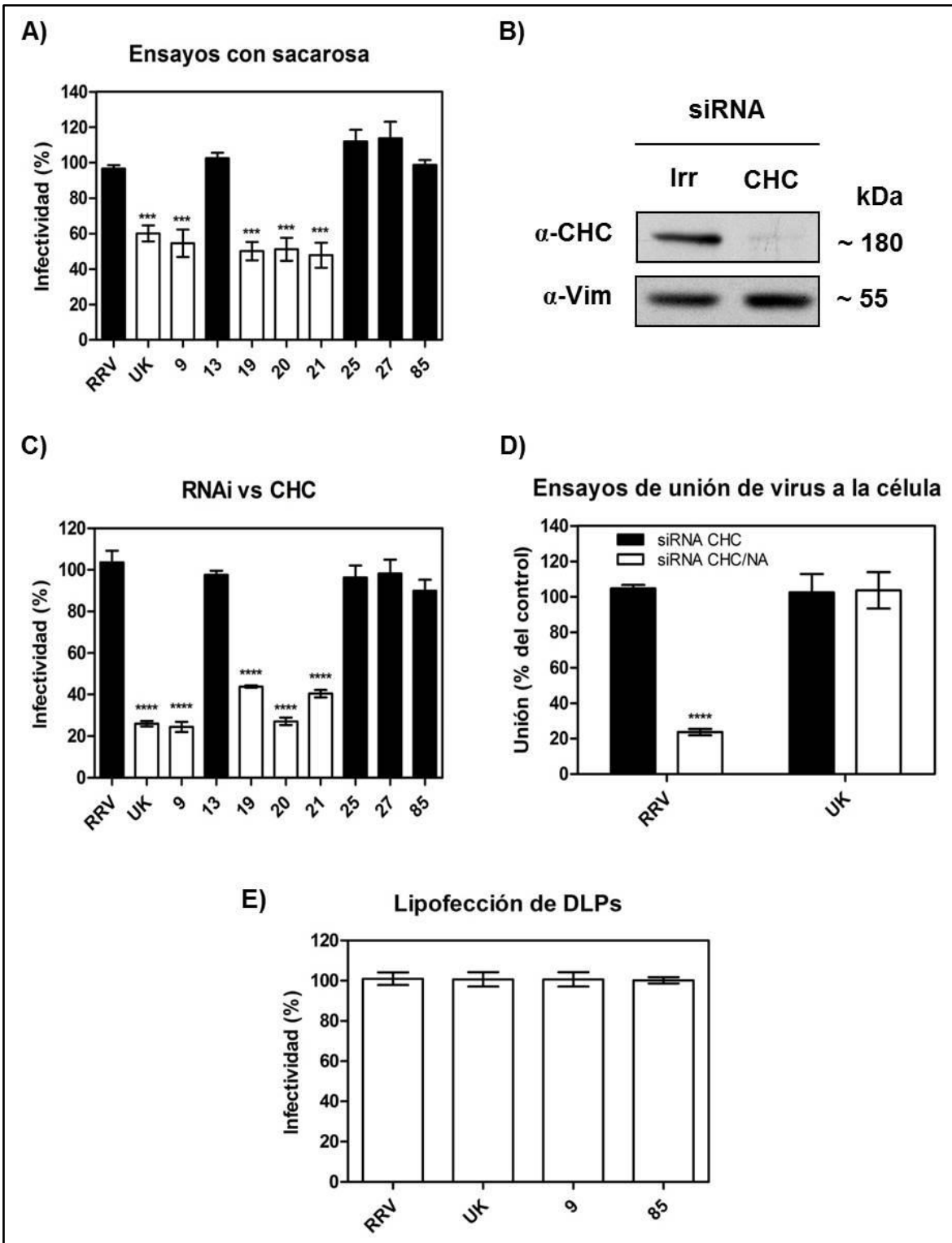


Figura 6. Efecto de tratamientos celulares que inhiben endocitosis mediada por clatrina en la infectividad de diferentes virus. A) Células tratadas con 250 mM de sacarosa se infectaron con los rotavirus RRV, UK y sus rearreglantes (ver tabla 1). Después del proceso de adsorción, las células se incubaron por 14 horas y posteriormente se fijaron y se inmunotñieron para detectar el antígeno viral, tal y como se ha descrito previamente

[17]. Las barras negras y blancas indican que los rearreglantes contienen la proteína VP4 originaria de RRV y UK respectivamente. **B)** Inmunoblot representativo para la determinación de la abundancia de la cadena pesada de clatrina (CHC) en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irr) o con siRNAs contra CHC. La detección de vimentina (Vim) fue usada como control de carga. Los anticuerpos (α -) son indicados. **C)** Células silenciadas para la expresión de CHC fueron infectadas con los rearreglantes UKxRRV. Como controles se usaron los virus UK y RRV. El proceso de infección y de inmunotinción se realizó como se describe en A). Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad en relación a la obtenida para cada uno de los virus en células sin tratamiento de sacarosa (A) ó tratadas con un interferente irrelevante (C). Los gráficos de A) y C) muestran el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado cada uno de ellos con su desviación estándar *******, $p < 0.001$; ********, $p < 0.0001$. **D)** Células transfectadas con el siRNA contra CHC (siRNA CHC) fueron tratadas o no con la enzima neuraminidasa (NA) y la unión de TLPs purificadas de RRV y UK fue evaluada por ELISA como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en porcentaje del virus pegado a la monocapa de MA104 en relación a la obtenida para cada uno de los rotavirus en células tratadas con un interferente irrelevante. El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado y las barras de error representan su desviación estándar. ********, $p < 0.0001$. **E)** DLPs de los virus indicados fueron lipofectadas en células cuya expresión de CHC fue silenciada previamente como se indica en Materiales y Métodos. El proceso de inmunotinción para detectar células infectadas se realizó como se describe en A). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes de lipofección realizados por duplicado cada uno de ellos.

infectividad de los rearreglantes conteniendo la proteína VP4 de RRV no se vió afectada por los tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina sugiere que estos virus podrían estar usando una ruta endocítica independiente de clatrina.

Con el objetivo de descartar la posibilidad de que el silenciamiento de la expresión de CHC hubiera afectado la disponibilidad de algún receptor del rotavirus UK usado para anclarse a la membrana plasmática y por ende su infectividad, la unión del virus en células silenciadas para CHC se evaluó mediante la técnica de ELISA (Fig. 6D). Debido a que la infectividad de RRV no se afecta por tal silenciamiento [2], y a que la unión de este rotavirus en células MA104 disminuye cuando las células son tratadas con la enzima NA [37], esta cepa fue usada como control en los ensayos de unión viral. Tal como se esperaba, el silenciamiento de CHC no afectó el pegado de RRV sobre la monocapa de MA104 (Fig. 6D, RRV, barra negra), mientras que su unión disminuyó cuando las células silenciadas para CHC además fueron tratadas con NA (Fig. 6D, RRV, barra blanca). Por su parte, la unión del rotavirus UK en células MA104 no se vió afectada significativamente en células cuya expresión de CHC fue previamente

silenciada (Fig. 6D, UK, barra negra), ni en aquellas que además del silenciamiento de CHC fueron tratadas con NA. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de CHC no afecta la disponibilidad del receptor celular usado por UK para anclarse a la membrana plasmática.

En este contexto, para confirmar que la disminución en la infectividad del rotavirus UK y de los rearreglantes que contienen a la proteína VP4 del mismo origen observada en células silenciadas para CHC fue debido a que se afectó la internalización viral en etapas tempranas de la entrada de los rotavirus, se evaluó la infectividad de DLPs lipofectadas en células previamente tratadas con el siRNA CHC. Las DLPs por sí solas no son infecciosas debido a que carecen de la capa proteica externa de la cápside de los rotavirus, la cual está formada por las proteínas VP4 y VP7 que interactúan con los receptores celulares y que promueven la internalización de los viriones en la célula [12]. Sin embargo, si las DLPs son lipofectadas en células (lipofección de DLPs), estas partículas virales son capaces de llegar al citoplasma celular [122], sin haber pasado por la interacción con receptores celulares que permitiría su ingreso en la célula.

En la figura 6E se observa que la infectividad de DLPs aisladas de los rotavirus RRV y UK, así como la de los rearreglantes 9 y 85 no se afectó al ser lipofectadas en células MA104 con la expresión de CHC silenciada (Fig. 6E). Este resultado sugiere que el efecto en la disminución de la infectividad de UK y de los rearreglantes conteniendo la proteína VP4 de su origen se debió a una inhibición en la entrada del virus a la célula y no por un paso posterior a ésta.

En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína VP4 de UK por sí sola es suficiente para dirigir la entrada de los rotavirus mediante una ruta endocítica mediada por clatrina.

XII. 2. Identificación de las proteínas virales implicadas en la endocitosis de RRV

El ciclo de replicación del rotavirus de simio RRV comienza con el anclaje de éste en la membrana plasmática de la célula huésped mediante la interacción

de la subunidad VP8 de la proteína VP4 y moléculas que contienen SA terminales. El tratamiento de las células con la enzima NA, que cataliza la hidrólisis de los SA terminales, genera una disminución en la infectividad de esta cepa debido a que se previene el anclaje de RRV en la célula [12]. Sin embargo, en nuestro grupo de investigación ha sido posible aislar rotavirus variantes de RRV que presentan un fenotipo de resistencia al tratamiento de las células con NA (virus NA-resistentes), y el rotavirus Nar3 es un ejemplo de ellos [37]. El análisis de la secuencia de los genes codificantes para las proteínas VP6, VP7 y VP4 de los virus RRV, Nar3 y de virus revertantes de este último (rNar3), entre ellos los revertantes 14 y 18 (rNar3-14 y rNar3-18, respectivamente), demostraron que el fenotipo de resistencia a NA estaba relacionado al cambio de un sólo aminoácido (K187R) localizado en la subunidad VP8 de la proteína VP4 [115]. Los datos anteriores fueron corroborados por Ludert et al. (1998) al encontrar la misma mutación en rotavirus rearreglantes que contenían a la proteína VP4 de RRV y que presentaban un fenotipo resistente a NA [123].

Se ha demostrado que Nar3 no requiere la interacción de VP8 con SA terminales usando a la integrina $\alpha 2\beta 1$ como receptor, la cual es reconocida por el tripéptido DGE presente en el dominio VP5 de la proteína VP4 [52, 124].

Los datos obtenidos con los rearreglantes UKxRRV presentados en la sección anterior sugieren que la proteína VP4 del rotavirus RRV podría estar implicada en dirigir su endocitosis por una ruta independiente de clatrina.

Con el objetivo de determinar si el cambio K187R en VP4 de la cepa RRV podría influenciar la ruta de internalización celular de Nar3, se evaluó el efecto del medio hipertónico y la dependencia de CHC en la infectividad de esta variante resistente a NA y de los virus revertantes rNar3-14 y rNar3-18. Sorpresivamente se encontró que la infectividad de la variante Nar3 disminuyó significativamente con los tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina, con respecto sus respectivos controles, mientras que las revertantes 14 y 18 no fueron afectadas (Fig. 7).

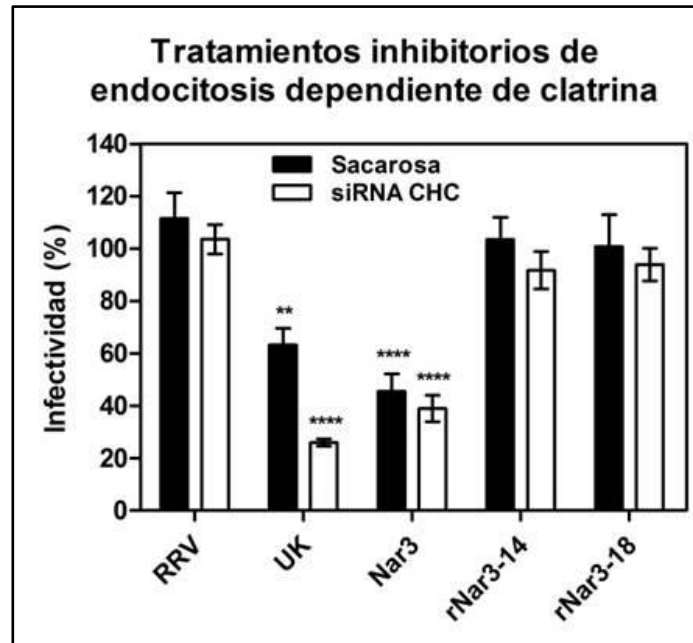


Figura 7. Identificación de la proteína VP4 como el factor viral implicado en los mecanismos de endocitosis de RRV en células MA104. Células tratadas con 250 mM de sacarosa (barras negras) ó transfectedas con el siRNA de CHC (barras blancas), fueron infectadas con los rotavirus variantes de RRV. Como controles se usaron los virus UK y RRV. El proceso de infección y de inmunotinción se realizó como se describe en la Figura 1A. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad en relación a la obtenida para cada uno de los virus en células sin tratamiento de sacarosa ó tratadas con un interferente irrelevante como según corresponde. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

Estos resultados sugieren de manera sólida que la modificación K187R en VP4 es suficiente para que RRV modifique su ruta de endocitosis, de una vía independiente de clatrina a una vía endocítica dependiente de clatrina, e indican también que VP4 es el único factor viral asociado a su internalización en células MA104 mediante la ruta endocítica mencionada.

XII. 3. Identificación de los dominios de VP4 de RRV implicados en los mecanismos de endocitosis en células MA104

Como se mencionó anteriormente, la variante resistente a NA, Nar3, se ancla a la membrana plasmática de la célula hospedera mediante la interacción de la integrina $\alpha 2\beta 1$ y el tripéptido DGE que se encuentra en la subunidad VP5 de la

proteína VP4 [52, 124]. El cambio del aminoácido K187R en la subunidad VP8 de VP4 está asociado con el fenotipo de resistencia a NA [115] sin embargo, esta variante aún mantiene el fenotipo de hemaglutinación similar al de RRV, el cual es inhibido con el tratamiento de los eritrocitos con NA o tratando al virus con la proteína glicoforina A (GphA), que contiene múltiples residuos de SA terminales [125], sugiriendo que Nar3 posee la capacidad de reconocer SA terminales [37]. Para evaluar el potencial papel de la interacción entre VP8 y SA terminales en la entrada dependiente de clatrina de los rotavirus, se evaluó la infectividad de Nar3, de sus revertantes y de los virus control RRV y UK, en células cuya expresión de CHC fue silenciada y posteriormente tratadas con NA (Fig. 8A).

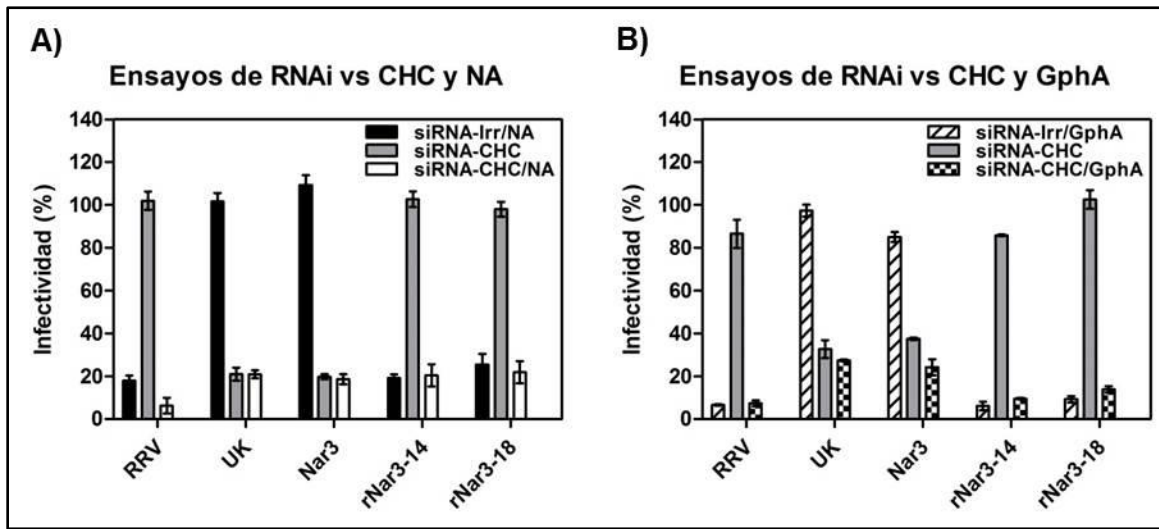


Figura 8. Identificación de los dominios de VP4 implicados en los mecanismos de endocitosis de RRV en células MA104. A) Células MA104 transfectadas con el siRNA de CHC fueron tratadas con NA por 1 hr y posteriormente infectadas con los virus indicados. Después del proceso de adsorción las células se incubaron por 14 horas y posteriormente se fijaron y se inmunotifieron para detectar el antígeno viral, tal y como se ha descrito previamente [17]. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad respecto al experimento control en el cual las células se transfectaron con un siRNA irrelevante y sin tratamiento con NA. **B)** Células MA104 transfectadas con el siRNA de CHC fueron infectadas con los virus indicados previamente tratados con GphA por 1 hr. Las condiciones de adsorción e inmunotinción se realizaron como en la Figura 1A. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad respecto al experimento control en el cual las células se transfectaron con un siRNA irrelevante y los virus no fueron tratados con GphA. En todos los gráficos se muestra el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado cada uno de ellos.

Como esperábamos, la infectividad de RRV disminuyó significativamente en las condiciones experimentales donde las células fueron tratadas con NA,

mientras que el silenciamiento de la expresión de la CHC por sí solo no provocó algún efecto en su infectividad. La infectividad de UK no se afectó por el tratamiento de las células con NA tal como ha sido reportado [38], pero disminuyó por el tratamiento de las células con los siRNAs para CHC (Fig. 8A).

Por su parte, la infectividad de Nar3 disminuyó significativamente cuando la expresión de CHC fue silenciada tal, como ocurrió con la cepa UK, y también la infectividad de esta variante de RRV disminuyó cuando las células MA104 se trataron simultáneamente con NA y con los siRNAs para CHC. Los rotavirus revertantes de Nar3 presentaron los fenotipos de infectividad tipo RRV cuando se evaluaron en las mismas condiciones (Fig. 8A). Estos resultados sugieren que la interacción de VP8 con SA terminales no es necesaria para la infectividad dependiente de CHC que presenta Nar3.

Para confirmar lo anterior, Nar3 y sus revertantes se trataron con GphA y su infectividad se evaluó en células transfectadas con el siRNA para CHC. Previamente se demostró que tanto RRV como Nar3 pueden unir GphA, sin embargo, el tratamiento de estos virus con la misma proteína sólo inhibe la infectividad de RRV mientras que la de Nar3 no se afecta [37]. Debido a lo anterior, el rotavirus RRV fue usado como control positivo en los experimentos mostrados en la Figura 8B. Como se había demostrado (Fig. 7), la infectividad de Nar3 disminuyó de manera significativa en células en las que la expresión de CHC fue silenciada por RNAi (Fig. 8B), tanto en condiciones donde el virus fue previamente tratado con GphA, como en la condición carente del tratamiento con dicha glicoproteína, mientras que los virus revertantes de Nar3 tuvieron fenotipos de infectividad similares a los que presentó el rotavirus control RRV (Fig. 8B). El rotavirus UK se usó como control negativo del ensayo debido a que no posee capacidad de hemaglutinación [126], y la infectividad de esta cepa sólo se afectó en condiciones donde se silenció la expresión de CHC independientemente de si el virus fue tratado o no con GphA (Fig. 8B).

Estos datos en conjunto sugieren que la endocitosis dependiente de clatrina de Nar3 podría ser guiada por la interacción de VP5 con la integrina $\alpha 2\beta 1$ o por una interacción subsecuente entre VP4 y algún otro receptor. También sugieren

que el dominio VP8 podría ser el posible responsable de dirigir la endocitosis atípica de RRV. Los resultados obtenidos hasta esta sección se publicaron en un primer artículo en el “Journal of Virology” [119], (ver anexo 1).

XII. 4. Caracterización del tráfico vesicular de los rotavirus UK, RRV, los rearreglantes UKxRRV y Nar3

Como se describió en la sección “VII. Antecedentes”, los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación y datos recientemente publicados sugieren que el rotavirus UK transita por compartimentos endosomales tempranos posterior a su ingreso en la célula [111, 112], mientras que el tráfico vesicular que sigue a la internalización de RRV termina en endosomas en maduración (ME) [4]. Datos también de nuestro laboratorio indican que la infectividad del rotavirus bovino UK parece depender de la expresión del CD-M6PR, en contraste con la infectividad de la cepa RRV que no depende de este factor celular [4, 5]. Todo esto sugiere que el tráfico vesicular podría ser diferente entre las cepas de RRV y UK.

Para determinar si el tráfico vesicular de los rotavirus RRV y UK está relacionado con alguna de sus proteínas de cápside, se evaluó la infectividad de estos rotavirus, de sus rearreglantes UKxRRV, y de las variantes de RRV Nar3 y sus revertantes, en células silenciadas para la expresión de las proteínas Rab7 y Rab9 (la isoforma Rab9a) mediante la técnica de RNAi (Fig. 9A). Cabe mencionar que como control negativo se usó a la cepa RRV debido a que su infectividad no se afecta por el silenciamiento de estas GTPasas [4], mientras que como control positivo del experimento se evaluó la infectividad de dos cepas de reovirus (ReoT1 y ReoT3) dado que su infectividad es dependiente de estas proteínas [127-130]. Como esperábamos, la infectividad de RRV no se vió afectada por el silenciamiento de Rab7 (Fig. 9B) o Rab9a (Fig. 9C), mientras que la infectividad de ReoT1 y ReoT3 disminuyó entre 70-80% con respecto a la condición control. Estos resultados indican que existen diferencias en la dependencia de estos factores celulares para la infectividad de las cepas RRV y UK, lo cual concuerda con algunas de las observaciones preliminares realizadas [5, 111], y sugieren

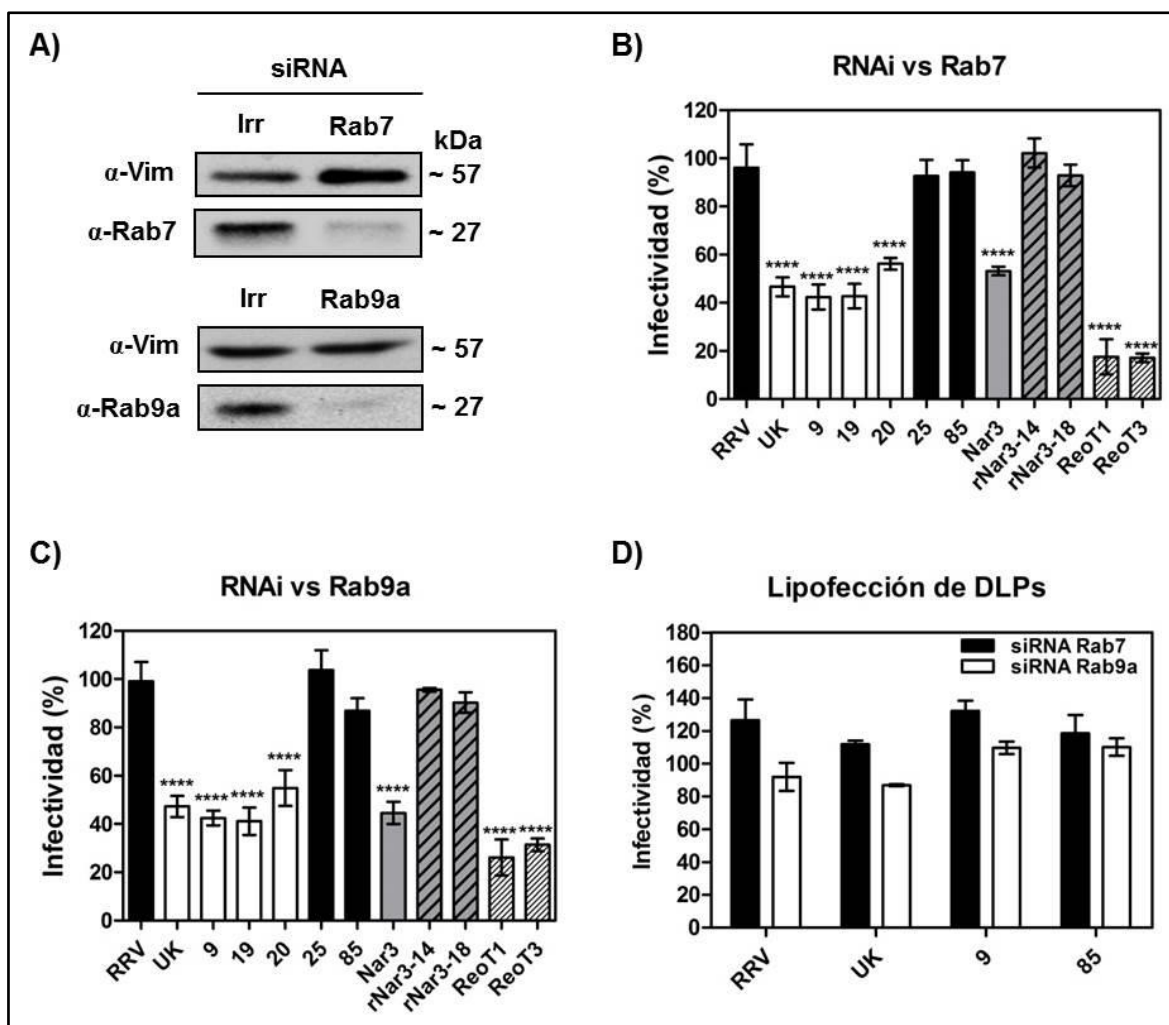


Figura 9. Efecto del silenciamiento de la expresión de proteínas reguladoras de tráfico vesicular en la infectividad de diferentes rotavirus. **A)** Inmunoblot representativo para la determinación de la abundancia de Rab7 y Rab9a en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irr), o con el correspondiente siRNA para las GTPasas pequeñas mencionadas. La detección de vimentina (Vim) fue usada como control de carga. Los anticuerpos (α -) son indicados. **B)** Células MA104 transfectadas con el siRNA de Rab7, o de Rab9a **(C)**, fueron infectadas con los virus indicados. Después del proceso de adsorción las células se incubaron por 14 horas y posteriormente se fijaron y se inmunotizaron para detectar el antígeno viral, como se ha descrito previamente [17]. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad respecto al experimento control en el cual las células se transfectaron con un siRNA irrelevante como se indica en Materiales y Métodos. ****, $p < 0.0001$. **D)** DLPs de los virus indicados fueron lipofectadas en células cuya expresión de Rab7 o Rab9a fue silenciada previamente como se indica en Materiales y Métodos. El proceso de inmunotinción para detectar células infectadas se realizó como se describe en la Figura 1A. En todas las gráficas se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado cada uno de ellos.

que la cepa UK requiere llegar a endosomas tardíos para alcanzar una infectividad eficiente, mientras que para la cepa RRV no es indispensable llegar hasta estos

organelos para una adecuada infectividad, aunque sí parece ser necesario su llegada hasta ME [4].

En el mismo contexto, la infectividad de los rearreglantes que tienen la proteína VP4 proveniente del rotavirus UK disminuyó significativamente al silenciar la expresión de Rab7 o Rab9a (Fig. 9B y 9C respectivamente), mientras que la infectividad de aquellos conteniendo en sus cápsides a la proteína VP4 originaria de la cepa RRV no se afectó al silenciar cualquiera de estas proteínas celulares. Estos resultados sugieren que los rearreglantes que tienen a la proteína VP4 de UK en su cápside y que consecuentemente son endocitados por una ruta dependiente de clatrina, requieren llegar a compartimentos endosomales tardíos justo como ocurre con el rotavirus parental UK. Interesantemente, la infectividad del rearreglante 19 que contiene a la proteína VP4 de UK y el resto de sus proteínas de cápside provenientes de la cepa RRV, se comportó de manera similar a la del rotavirus bovino, sugiriendo sólidamente que el tráfico vesicular de UK también está determinado únicamente por su proteína VP4.

Con ensayos de lipofección de DLPs, de algunos de los rotavirus usados en células silenciadas para Rab7 o Rab9a, se pudo confirmar que el efecto en la disminución de su infectividad se debió a algún paso en la entrada viral ya que al lipofectar DLPs de los virus indicados su infectividad no se afectó por los silenciamientos de estas GTPasas (Fig. 9D).

El hecho de que la infectividad de RRV y de los rearreglantes que tienen su proteína VP4 no dependa de la expresión de Rab7 y Rab9a sugiere que: 1) el fenotipo de infectividad resistente al silenciamiento de estas GTPasas está relacionado con su proteína VP4 y, 2) que la compartimentalización de estos virus en endosomas tardíos no es importante para su infectividad.

Para confirmar si la proteína VP4 de RRV determina el fenotipo de infectividad descrito arriba, se evaluó la infectividad de la variante Nar3 y de sus revertantes rNar3-14 y rNar3-18 en células transfectadas con los siRNAs para Rab7 o Rab9a. De interés, la infectividad de la variante NA-resistente de RRV Nar3 disminuyó significativamente cuando se evaluó en células silenciadas para

Rab7 (Fig. 9B) y para Rab9a (Fig. 9C), pero la infectividad de sus revertantes no se afectó como ocurrió con RRV.

Todos estos datos en conjunto sugieren sólidamente que la proteína de cápside VP4, además de dirigir la internalización de los rotavirus RRV y UK por diferentes vías de endocitosis (Fig. 6 y 7), también está relacionada con su tráfico vesicular.

Previamente se reportó que el silenciamiento de la expresión de CD-M6PR no afecta la infectividad del rotavirus cepa RRV [4], pero disminuye la del rotavirus UK [5]. El CD-M6PR tiene un importante papel en transportar factores celulares, como hidrolasas, del TGN hacia endosomas tardíos, lo cual se piensa que ayuda en la maduración de estos organelos y de los lisosomas [106]. Tomando en cuenta lo anterior, y que la cepa UK así como los rearreglantes UKxRRV que contienen su proteína VP4 requieren llegar a endosomas tardíos (Fig. 9), sería lógico esperar que la infectividad dependiente de CD-M6PR de UK estuviera determinada por su proteína VP4. Para corroborar esto, se evaluó la infectividad de los rearreglantes UKxRRV en células silenciadas para el CD-M6PR (Fig. 10A), donde los rotavirus RRV y UK fueron usados como controles del experimento. Los reovirus tipo 1 y 3 (ReoT1 y ReoT3) también fueron empleados como controles debido a que la infectividad de estos virus requiere de proteasas endosomales (catepsinas) [131, 132], las cuales son factores celulares transportados por el CD-M6PR [108].

En este sentido y como se esperaba, la infectividad de RRV así como la de los rearreglantes que tienen la proteína VP4 del mismo origen viral no se afectó al silenciar la expresión de CD-M6PR (Fig. 10A), mientras que la infectividad de UK y de los rearreglantes que tienen la proteína VP4 del rotavirus bovino disminuyó significativamente (Fig. 10B). La infectividad de los virus ReoT1 y ReoT3, los cuales requieren de las catepsinas transportadas por los M6PRs para infectar a la célula huésped, disminuyó alrededor de un 50%. Sin embargo, aunque Nar3 requiere llegar a endosomas tardíos para infectar a las células (Fig. 9B y 9C), sorprendentemente su infectividad no se vió afectada en células en las que la expresión del CD-M6PR fue silenciada (Fig. 10B).

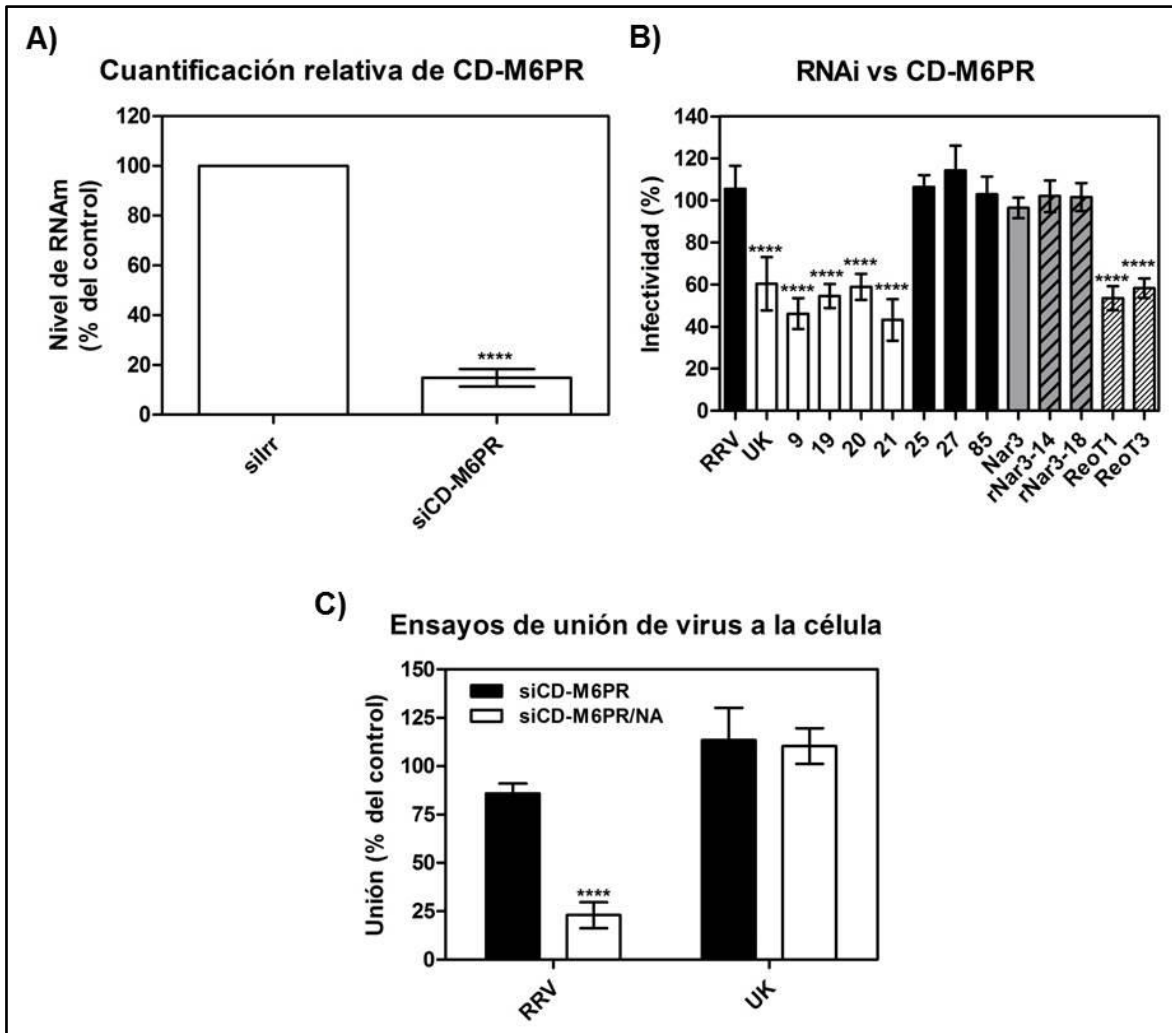


Figura 10. Efecto del silenciamiento de la expresión de CD-M6PR en la infectividad de los rearreglantes UKxRRV y de las variantes de RRV. A) La expresión de CD-M6PR a nivel de mRNA fue determinado en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (silrr) o uno contra este receptor (siCD-M6PR), mediante la técnica de qRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados en porcentaje del mRNA de CD-M6PR detectado en células tratadas con el siCD-M6PR respecto al observado en células tratadas con el silrr. La gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado cada uno. ****, $p < 0.0001$. **B)** Células transfectadas con el interferente contra CD-M6PR fueron infectadas con los virus indicados. Los procesos de infección y de inmunotinción se realizaron como se describe en la Figura 1A. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad en relación a la obtenida para cada uno de los virus en células tratadas con un interferente irrelevante. La gráfica muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado. ****, $p < 0.0001$. **C)** Células transfectadas con el siRNA contra CD-M6PR (siCD-M6PR) fueron tratadas o no con la enzima neuraminidasa (NA) y la unión de TLPs purificadas de RRV y UK fue evaluada por ELISA como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en porcentaje del virus pegado a la monocapa de MA104 en relación a la obtenida para cada uno de los rotavirus en células tratadas con un interferente irrelevante. Se muestra el promedio y la desviación estándar procedentes de dos experimentos independientes realizados por duplicado cada uno de ellos. ****, $p < 0.0001$.

La infectividad de las revertantes de Nar3, rNar3-14 y 18, fue similar a los fenotipos de infectividad observados para RRV en células tratadas bajo las mismas condiciones (Fig. 10B).

Para confirmar que la disminución en la infectividad observada para el rotavirus bovino y los rearreglantes que tienen su proteína VP4 (Fig. 10B) se debió a que algún proceso dependiente de CD-M6PR en la entrada de estos virus fue afectado, y no un paso posterior a éste, se evaluó la infectividad de DLPs de RRV y UK lipofectadas en células silenciadas para este receptor, no encontrando disminución en ninguno de los casos (datos no mostrados).

Para descartar que el silenciamiento de la expresión de CD-M6PR hubiera afectado la disposición o la correcta maduración del receptor de anclaje de UK en la membrana plasmática, disminuyendo su infectividad y la de los rearreglantes que tienen su proteína VP4 en la cápside, se realizaron ensayos de unión viral a la célula, similares a los descritos en la sección I de resultados. El pegado de RRV o UK en monocapas de MA104 no se afectó significativamente al silenciar la expresión de CD-M6PR (Fig. 10C, barras negras). Al tratar con NA células MA104 silenciadas para CD-M6PR se observó una disminución en el pegado de RRV a la monocapa pero no del virus UK (Fig. 10C, barras blancas), como era de esperarse. Estos datos sugieren que el silenciamiento de la expresión de este receptor no afecta la unión del virus a la célula, y que la disminución en la infectividad que se observa para UK y los rearreglantes que tienen su proteína VP4 (Fig. 10B) se debe al bloqueo de un paso posterior al pegado viral pero anterior a que las DLPs alcancen el citoplasma.

Recapitulando, todos estos resultados sugieren que el rotavirus UK y los rearreglantes que tienen su proteína VP4 requieren de factores celulares, transportados por el CD-M6PR del TGN hacia endosomas tardíos para su entrada en células MA104, mientras que Nar3, aunque requiere llegar estos compartimentos endosomales, no requiere de factores celulares transportados por dicho receptor para su infectividad. Además, también indican que la proteína VP4

de los rotavirus UK y RRV está relacionada con el tráfico vesicular que es diferente entre estas cepas.

XII. 5. Caracterización de la vía de entrada de cepas de rotavirus que tienen diferentes requerimientos de receptores celulares

Mientras que los procesos de endocitosis por los cuales los rotavirus se internalizan en la célula huésped han sido reportados sólo para algunas de sus cepas [2, 3], su tráfico vesicular ha sido poco caracterizado [4, 112].

Debido a que nuestros resultados sugieren que VP4 es la proteína responsable de dirigir la ruta endocitosis que usan los rotavirus para infectar a las células, se decidió investigar el mecanismo de internalización de cepas de rotavirus que tienen diferentes genotipos “P”, y que presentan diferentes requerimientos de receptores celulares respecto a las cepas caracterizadas RRV y UK (Tabla 1), con el propósito de averiguar si existe alguna correlación entre los receptores celulares requeridos para su infectividad y su endocitosis y/o tráfico vesicular.

La dependencia de la endocitosis mediada por clatrina en la infectividad de los rotavirus NA-sensibles SA11-4S y YM, así como de los rotavirus humanos NA-resistentes WI61 y DS-1 fue evaluada en células MA104 tratadas con medio hipertónico (250 mM de sacarosa) o transfectadas con siRNAs contra CHC (Fig. 11A). Como virus controles se usaron las cepas RRV y Wa debido a que la infectividad de la primera no es afectada por estos tratamientos mientras que la infectividad de la segunda es sensible en las mismas condiciones [2, 3].

Interesantemente, la infectividad de los rotavirus NA-sensible SA11-4S y YM disminuyó significativamente en ambas condiciones (Fig. 11A). De manera similar, la infectividad de las cepas humanas de rotavirus probadas disminuyó significativamente entre 50 y 75% en células tratadas con sacarosa o en células en las que la expresión de CHC fue silenciada (Fig. 11A). Estos resultados sugieren que diferentes interacciones entre la superficie celular y las proteínas de cápside de los rotavirus (exceptuando RRV), pueden llevar a que estos patógenos sean internalizados mediante endocitosis mediada por clatrina.

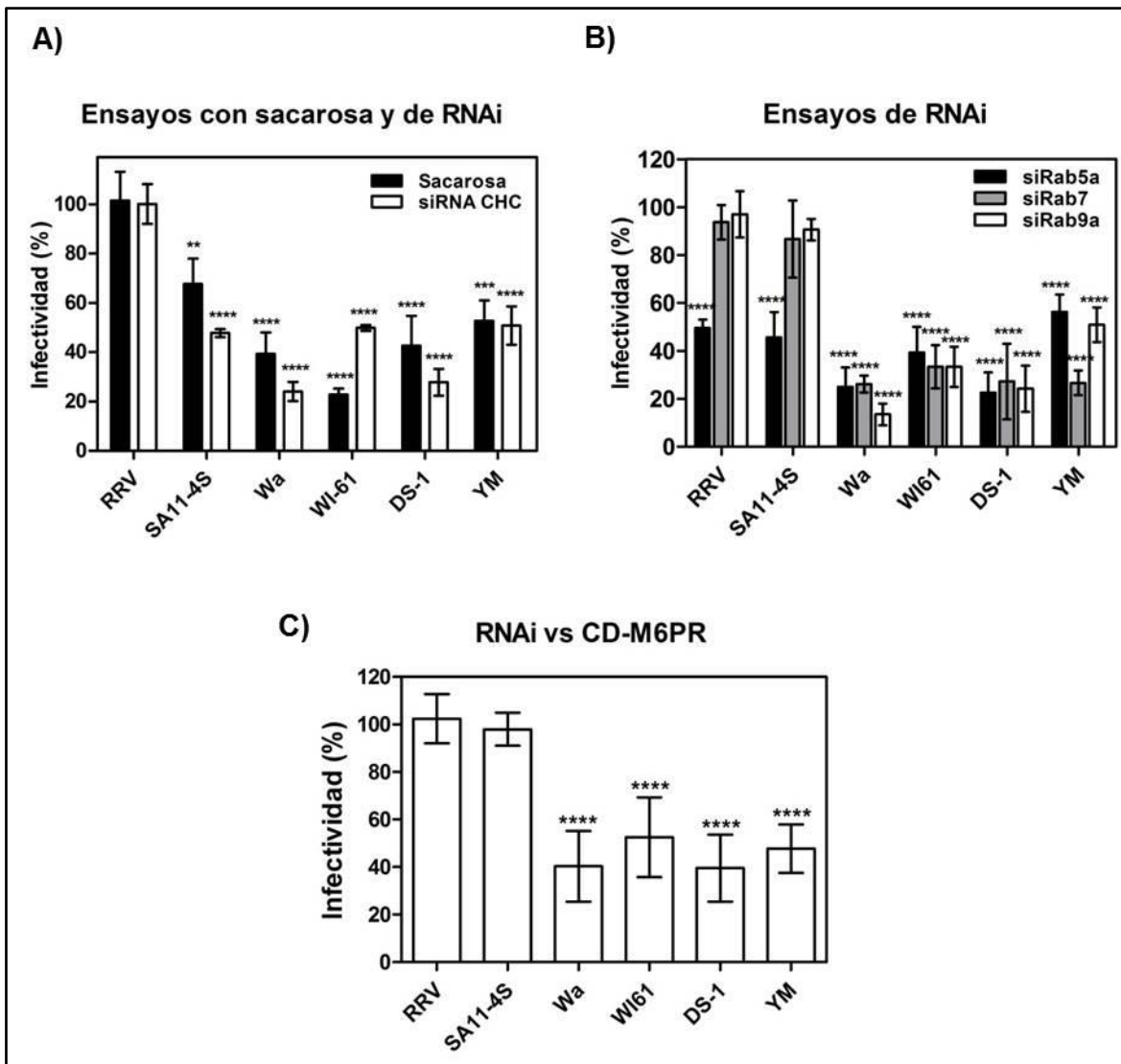


Figura 11. Efecto de tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina o del silenciamiento de la expresión de proteínas de tráfico vesicular en la infectividad de diferentes virus. A) Células tratadas con 250 mM de sacarosa o transfectadas con el siRNA de CHC, fueron infectadas con los rotavirus indicados. **B)** Células transfectadas con los siRNAs para Rab5, Rab7 o Rab9, fueron infectadas con los virus indicados. **C)** Células silenciadas para CD-M6PR fueron inoculadas con los virus indicados. En todos los casos, los procesos de adsorción e inmunotinción para detectar antígeno viral se realizó como se ha descrito previamente [17]. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad en relación a la obtenida para cada uno de los virus en células sin tratamiento de sacarosa o tratadas con un interferente irrelevante como según corresponde. Los gráficos muestran el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Para evaluar el tráfico vesicular de estas cepas de rotavirus, se usó el enfoque de RNAi descrito arriba. La infectividad de todas las cepas de rotavirus probadas disminuyó al silenciar la expresión de la GTPasa Rab5a (Fig. 11B). La

infectividad del virus control RRV, así como la del rotavirus de simio SA11-4S no se afectó en células transfectadas con los siRNAs contra Rab7 o Rab9a. Sin embargo, la infectividad de las cepas de rotavirus Wa, WI-61, DS-1 y YM fue sensible al silenciamiento de estas GTPasas reguladoras de la formación de endosomas tardíos (Fig. 11B). Estos resultados sugieren que estos virus, con las excepciones de SA11-4S y el virus control RRV, requieren llegar a endosomas tardíos para infectar a la célula huésped.

La dependencia a la expresión de CD-M6PR en la infectividad de estos virus también fue evaluada. El silenciamiento de la expresión de este receptor no afectó la infectividad del virus control RRV como se esperaba, mientras que tampoco afectó la infectividad de la cepa de simio SA11-4S (Fig. 11C). En contraste, la infectividad del resto de las cepas de rotavirus empleadas se afectó significativamente por el silenciamiento de la expresión de CD-M6PR (Fig. 11C).

Estos resultados sugieren que, mientras el rotavirus SA11-4S requiere llegar al menos a endosomas tempranos para infectar a la célula huésped, los rotavirus humanos Wa, WI61 y DS-1, así como el rotavirus porcino YM, requieren llegar a endosomas tardíos para su adecuada infectividad.

XII. 6. Evaluación de las catepsinas como potenciales factores celulares involucrados en la entrada de los rotavirus

Los datos mostrados en las secciones anteriores sugieren que con la excepción de Nar3, todos los rotavirus que requieren llegar a endosomas tardíos para su infectividad también requieren de la expresión del CD-M6PR. Debido a que este receptor transporta hidrolasas ácidas desde TGN hacia endosomas tardíos [108], nuestros datos también sugieren que factores celulares como proteasas ácidas pudieran estar involucradas en la entrada de las cepas de rotavirus que requieren de la expresión de CD-M6PR.

Para indagar lo anterior expuesto y formando parte de la caracterización de la vía de entrada de las cepas de rotavirus con genotipo “P” diferente a los de las cepas RRV y UK empleadas a lo largo de este trabajo, se evaluó su infectividad en

células MA104 tratadas con el inhibidor de proteasas de amplio espectro leupeptina (Fig. 12A). Como controles se usó al rotavirus RRV cuya infectividad no es sensible al tratamiento de este inhibidor de proteasas [67], y también se usó reovirus (ReoT3) como control positivo dado que es un virus que requiere de proteasas endosomales para infectar células [133]. Como se esperaba, la infectividad del rotavirus RRV no se afectó mientras que la del reovirus ReoT3 disminuyó significativamente (Fig. 12A). Por su parte, la infectividad de los rotavirus SA11, Nar3 y su revertante 14 no se afectó cuando las células se trataron con leupeptina, mientras que la infectividad de los rotavirus UK, Wa, WI61, DS-1 y YM en células tratadas bajo las mismas condiciones disminuyó significativamente (Fig. 12A).

Para conocer si las catepsinas B y L, dos proteasas endosomales involucradas en la entrada celular de varios virus incluyendo a reovirus [131], pudieran tener algún papel en la infección de los rotavirus probados en la figura 11A, se evaluó su infectividad en células tratadas con inhibidores selectivos de catepsinas B o L (Fig. 12B o 12C, respectivamente). La infectividad de las cepas de rotavirus UK, Wa, WI61 y DS-1, así como de la del virus control ReoT3, que resultó sensible al tratamiento de las células con leupeptina (Fig. 12A), también resultó sensible al tratamiento con inhibidores de las catepsinas B y L, disminuyendo significativamente en ambos casos (Fig. 12B o 12C respectivamente).

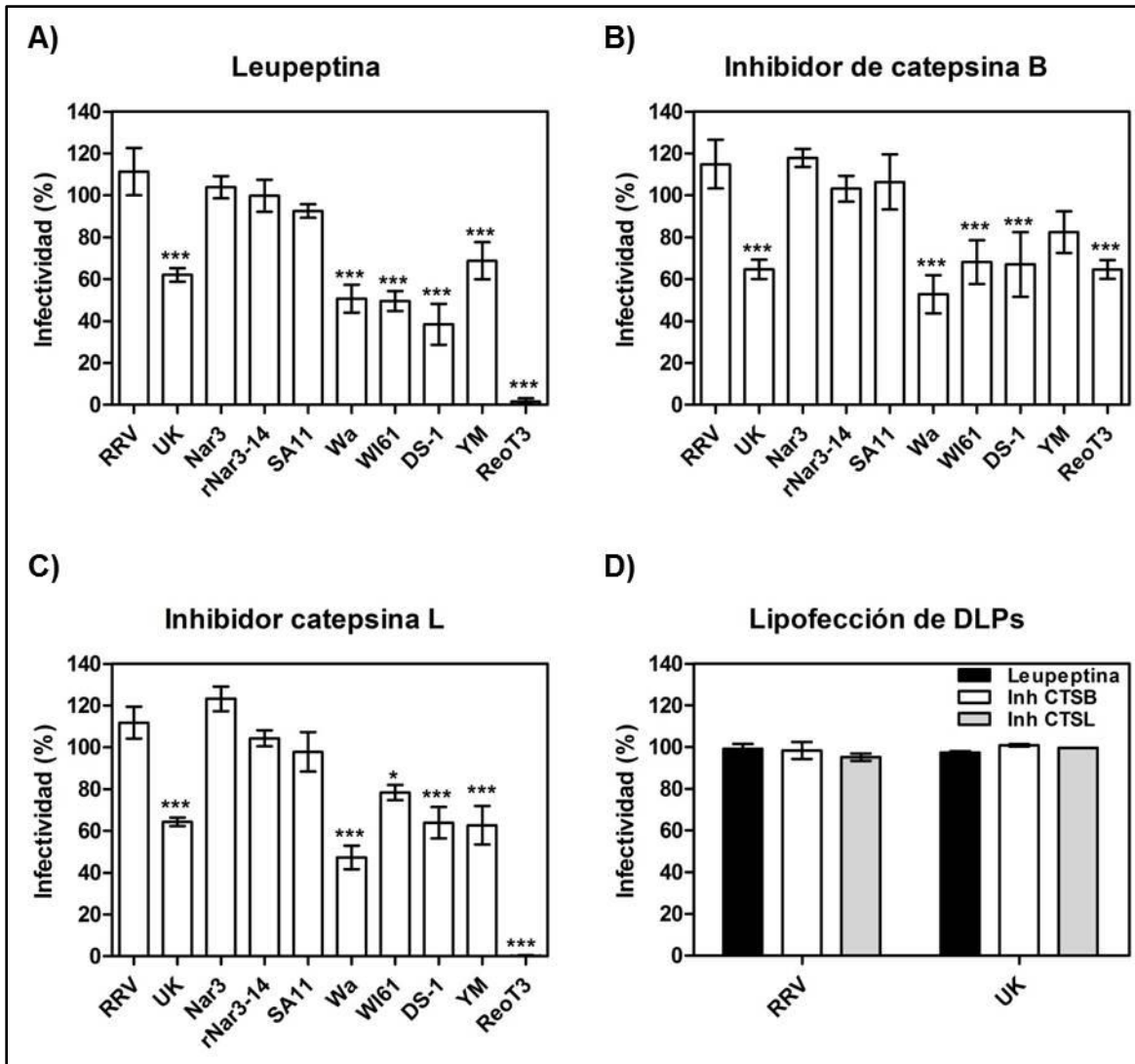


Figura 12. Efecto del tratamiento de las células con inhibidores de proteasas en la infectividad de diferentes virus. Células tratadas con **A)** Leupeptina, **B)** Inhibidor de catepsina B, o **C)** Inhibidor de catepsina L como se indica en materiales y métodos, fueron infectadas con las cepas de virus indicadas. Los procesos de adsorción viral e inmunotinción para detectar antígeno viral se realizaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad en relación a la obtenida para cada uno de los virus en células “mock” tratadas con el correspondiente inhibidor de proteasa indicado. Los gráficos muestran el promedio y desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **D)** DLPs de las cepas RRV y UK fueron lipofectadas en células tratadas con los inhibidores de proteasas indicados. El proceso de inmunotinción para detectar células infectadas se realizó como se describe en la Figura 1A. En el gráfico se muestra el promedio y la desviación estándar de 2 experimentos independientes realizados por duplicado cada uno de ellos.

Aunque la infectividad de la cepa de rotavirus YM disminuyó en células tratadas con ambos inhibidores de catepsinas, la disminución fue estadísticamente significativa sólo en el caso de las células tratadas con el inhibidor para catepsina

L, mientras que las cepas de rotavirus que no fueron sensibles al tratamiento de las células con leupeptina (RRV, Nar3, rNar3-14 y SA11), tampoco mostraron alguna disminución en su infectividad al tratar a las células con los inhibidores de catepsinas (Fig. 12B o 12C, respectivamente).

Para tener evidencia de que la disminución en la infectividad de las cepas de rotavirus sensibles al tratamiento de las células con los inhibidores de proteasas se debe a que se afecta algún paso en la entrada celular como en el caso de reovirus [131], se lipofectaron DLPs del rotavirus bovino UK en células tratadas con los inhibidores mencionados y se evaluó su infectividad (Fig. 12D). Como control se lipofectaron DLPs de RRV en células tratadas bajo las mismas condiciones. La infectividad de las DLPs de ambos virus no se afectó por el tratamiento de las células con leupeptina, ni por los inhibidores de catepsina B o L (Fig. 12D). Los resultados de la figura 11 sugieren que los rotavirus UK, Wa, WI61, DS-1 y YM, los cuales deben de llegar a endosomas tardíos para infectar la línea celular MA104, también requieren de las catepsinas B y L para el proceso de entrada viral en estas células.

Para confirmar lo anterior se evaluó la infectividad de los mismos virus en células en las que la expresión de las catepsinas B, L (la isoforma L1) y S, fue silenciada en células MA104 (Fig. 13A). Como control negativo se empleó al rotavirus RRV y como controles negativos se emplearon los reovirus ReoT1 y ReoT3. La infectividad de los virus control en células silenciadas para cualquiera de las catepsinas mencionadas se comportó como se esperaba: la infectividad de RRV no se afectó mientras que la de ReoT1 y ReoT3 disminuyó significativamente (Fig. 13B, C y D). Para el caso de las cepas de rotavirus UK, Wa, WI61, DS-1 y YM, las cuales requieren llegar a endosomas tardíos para infectar a las células, se observó una disminución significativa en su infectividad en células silenciadas para las catepsinas B, L1 y S, en contraste con las cepas de rotavirus, Nar3, rNar3-14 y SA11 (Fig. 13B, C, D). Estos datos indican que la expresión de las catepsinas es importante para la infectividad de los rotavirus que requieren llegar a endosomas tardíos (con la excepción de Nar3).

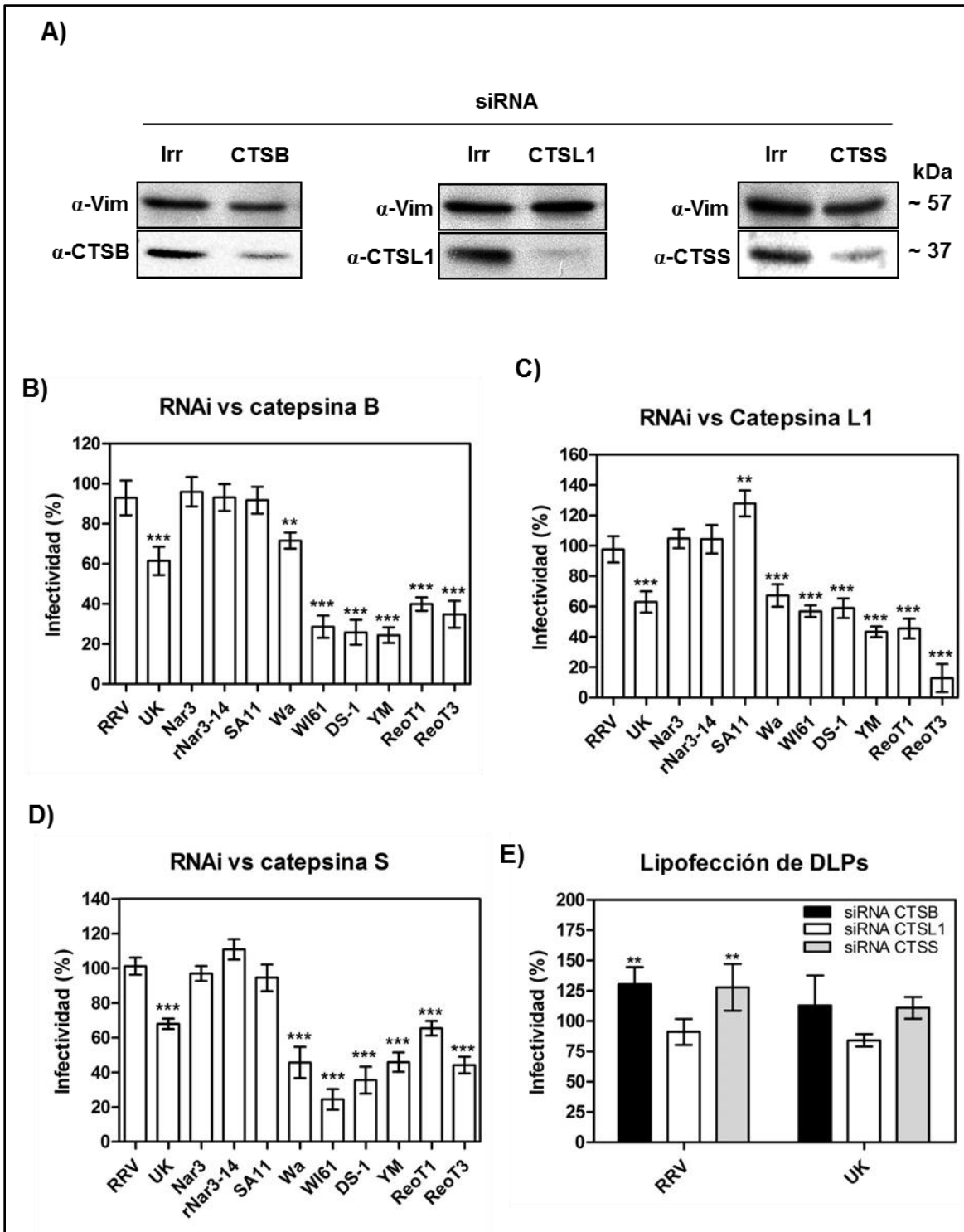


Figura 13. Efecto del silenciamiento de la expresión de diferentes catepsinas en la infectividad de diferentes virus. A) Inmunoblots representativos de la detección de la abundancia de las catepsinas B (CTSB), L1 (CTSL1) o S (CTSS) en células MA104 transfectadas con un siRNA irrelevante (Irr) o con el siRNAs correspondiente para cada catepsina como se indica. La detección de vimentina (Vim) fue usada como control de carga. Los anticuerpos (α -) para detectar cada una de las proteínas son indicados. Células transfectadas con siRNAs contra **B)** catepsina B, **C)** catepsina L1, o **D)** catepsina S, fueron

infectadas con las cepas de virus indicadas. Los procesos de adsorción viral e inmunotinción para detectar antígeno viral se realizaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en porcentaje de infectividad en relación a la obtenida para cada uno de los virus en células transfectadas con un siRNA irrelevante. Los gráficos muestran el promedio y desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes, cada uno de estos realizado por duplicado. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **E)** DLPs de las cepas RRV y UK fueron lipofectadas en células transfectadas con siRNAs contra catepsinas B (CTSB), L1 (CTSL1) o S (CTSS). El proceso de inmunotinción para detectar células infectadas se realizó como se describe en la Figura 1A. En el gráfico se muestra el promedio y la desviación estándar de 2 experimentos independientes realizados por duplicado cada uno de ellos. **, $p < 0.01$.

Para confirmar que la disminución en la infectividad del rotavirus UK en células silenciadas para las catepsinas mencionadas arriba fuera debido a que se interfirió con algún paso en la entrada del virus como cuando se usaron inhibidores de proteasas (Fig. 12), se lipofectaron DLPs de las cepas de rotavirus RRV (control) y UK en células transfectadas con siRNAs contra catepsina B, L1 o S. La infectividad de las DLPs del virus RRV aumentó significativamente en células silenciadas para catepsina B o S, pero no se afectó en células cuya expresión de catepsina L1 fue previamente silenciada (Fig. 13E). La infectividad de las DLPs de UK no se afectó en células transfectadas con cualquiera de los interferentes contra catepsinas (Fig. 13E). Estos datos indican que la expresión de las catepsinas es importante para la entrada del rotavirus bovino UK en células MA104.

En conjunto, los resultados mostrados sugieren que los rotavirus UK, Wa, WI61, DS-1 y YM, requieren llegar a endosomas tardíos para su infectividad y también requieren de proteasas endosomales (comprobado para catepsinas B, L o S; Figs. 12 y 13) para entrar en células MA104, en contraste con la variante Nar3, la cual también requiere llegar a endosomas tardíos pero no requiere de las catepsinas probadas para entrar en células MA104. Lo anterior concuerda con los resultados de infectividad del CD-M6PR, el cual transporta hidrolasas procedentes de TGN hacia endosomas tardíos. Mientras que Nar3 no requiere de la expresión de este receptor, el resto de los rotavirus que llegan a endosomas tardíos probados en este trabajo, también requieren de la expresión del CD-M6PR. Los rotavirus RRV, SA11 y revertantes de Nar3 no requieren llegar a endosomas tardíos, ni CD-M6PR o las catepsinas probadas para entrar en células MA104.

Parte de estos resultados se publicaron en un segundo artículo en el “Journal of Virology” **[134]**, (ver anexo 2).

XIII. DISCUSIÓN

La internalización de los rotavirus en células MA104 ocurre mediante diferentes mecanismos de endocitosis dependiendo de la cepa [2, 3]. Aprovechando las diferencias en las vías de entrada que presentan los rotavirus UK y RRV, se usó una colección de virus rearreglantes entre estas cepas para determinar cuáles son los factores virales que segregan con el tipo de endocitosis empleada.

El análisis de los rearreglantes sugirió que la proteína VP4 define la endocitosis mediada por clatrina del rotavirus UK y también fueron sugerentes de que esta proteína podía mediar la entrada independiente de clatrina de RRV. A pesar de que se ha propuesto que algunas moléculas de superficie celular tienen un papel importante durante la entrada del rotavirus UK (Tabla 1), aún no ha sido identificado el receptor celular mediante el cual este virus se ancla en células MA104. Debido a esto, es difícil encontrar alguna correlación entre algún receptor celular propuesto para el rotavirus UK, así como la identificación del dominio de la proteína VP4 relacionado con la internalización dependiente de clatrina observada para este virus. No obstante, cualquiera que sea el receptor empleado por la cepa bovina de rotavirus UK para internalizarse en células MA104, nuestro trabajo sugiere que la activación de la endocitosis mediada por clatrina de este virus está mediada por su proteína VP4.

Mediante el análisis de la entrada del rotavirus Nar3 y sus revertantes pudimos demostrar y confirmar que la endocitosis independiente de clatrina por la que se internaliza RRV en células MA104 es dirigida también por su proteína VP4. El cambio de ruta endocítica observada en Nar3 podría estar relacionada al cambio en el requerimiento del receptor de anclaje a las células respecto al que utiliza RRV [52], tal como ha sido reportado en los casos de echovirus [135], enterovirus [136-138], coxsackievirus [139-141] y del virus de la fiebre aftosa [142-144], en donde el cambio de uno o varios aminoácidos en las proteínas de su cápside resulta en el requerimiento de diferentes receptores celulares y de la ruta endocítica por la cual se internalizan en la célula respecto a los virus silvestres.

Además, los resultados obtenidos usando la combinación de los enfoques de RNAi y del tratamiento de las células con NA o de los virus con GphA (Fig. 8), sugieren que la internalización de Nar3 mediante endocitosis dependiente de CHC podría ser activada por la interacción de algún receptor celular con el dominio VP5 de su proteína VP4 (Tabla 1).

En este trabajo también se observó que diferentes cepas de rotavirus que poseen diferentes requerimientos de receptores celulares pueden ingresar en células MA104 mediante endocitosis mediada por clatrina (Fig. 11A). Sin embargo, no pudimos encontrar alguna correlación entre el requerimiento de algún receptor celular o el genotipo P de estos virus y el mecanismo de endocitosis por el cual se internalizan en la célula. Asimismo, no pudimos contar con otro virus del mismo genotipo P que RRV (P[3]) para poder evaluar si la ruta de endocitosis atípica de este virus en células MA104 pudiera estar relacionada con el genotipo P que posee.

El presente trabajo también contribuyó al conocimiento del tráfico vesicular de los rotavirus, el cual hasta antes de éste había sido poco caracterizado. Mostramos que todas las cepas de rotavirus estudiadas hasta el momento requieren de la expresión de Rab5a para su infectividad, lo cual en conjunto con ensayos de sobreexpresión de dominantes negativas y co-localización del virus con esta GTPasa pequeña mediante microscopía de inmunofluorescencia [4, 5], sugieren que las diversas cepas virales requieren llegar a endosomas tempranos para su infectividad. La evidencia experimental sugiere también que, una vez que transitan por este compartimento endosomal, todas las cepas de rotavirus evaluadas en este trabajo transitan por endosomas en maduración, lugar de donde probablemente el rotavirus RRV es liberado hacia el citoplasma para seguir con su ciclo de replicación [4, 5]. En ese sentido, es posible que los rotavirus SA11-4S y revertantes de Nar3 (rNar3-14 y 18), los cuales requieren de la GTPasa Rab5a para su infectividad, también pudieran requerir transitar a ME durante su tráfico vesicular, pero no a compartimentos endosomales tardíos como lo sugieren los resultados de infectividad en células silenciadas para la expresión de Rab7, Rab9a y CD-M6PR (Fig. 9B, 9C y 11B).

Por otra parte, la dependencia de Rab7 y Rab9a para la infectividad de los rotavirus UK, Wa, WI61, DS-1 y YM, sugiere que estos virus requieren de endosomas tardíos funcionales para infectar a la célula hospedera (Fig. 11B), en contraste con RRV cuya infectividad no depende de estas GTPasas [4, 5].

El proceso de maduración de los endosomas tardíos incluye el intercambio de proteínas en la membrana endosomal, la adquisición de componentes lisosomales, la disminución en el pH luminal, el movimiento hacia el área perinuclear, y cambios en su morfología [106]. Dentro de los componentes que adquieren los endosomas tardíos en su maduración, se encuentran proteínas provenientes de TGN que son llevadas hacia éstos y viceversa [106, 145, 146]. Los ejemplos más caracterizados de estas proteínas son los M6PR, como el CD-M6PR que transporta hidrolasas como las catepsinas hacia los endosomas tardíos [106].

Interesantemente, los datos indican que el CD-M6PR es importante para la infectividad de los rotavirus que requieren llegar a endosomas tardíos con la excepción de Nar3 (Figs. 10B y 11C). Adicionalmente, este trabajo sugiere que proteasas endosomales como las catepsinas B, L y S, son requeridas para la entrada celular de las mismas cepas de rotavirus cuya infectividad depende también del CD-M6PR, lo cual correlaciona con el hecho de que este receptor transporta proteasas endolisosomales [106]. En el mismo sentido, el hecho de que la infectividad de Nar3 no dependa de la expresión de CD-M6PR correlaciona con el hecho de que la actividad de catepsinas no son requeridas para su infectividad y sugiere que, la dependencia en llegar a endosomas tardíos para su entrada en la célula posiblemente pudiera estar relacionada con el requerimiento del pH y/o otros factores celulares.

Se ha documentado que cisteín-proteasas como las catepsinas B, L y S tienen un papel importante en el procesamiento de proteínas de la cápside y en la entrada de reovirus [131, 132], un virus perteneciente a la misma familia de virus no-envueltos que los rotavirus y que requiere llegar a endosomas tardíos para infectar a las células [127-130]. Las catepsinas B y L también han sido implicadas en la entrada a la célula de varios otros virus. Ambas catepsinas llevan a cabo el

procesamiento de la glicoproteína GP del virus Ebola, esencial para la liberación del material viral en el citosol [147]. También ha sido demostrado que el procesamiento de la subunidad GP1 por la catepsina B expone un dominio de unión para el transportador endolisosomal de colesterol Niemann-Pick tipo C1, lo cual promueve la fusión viral con la membrana de endosomas tardíos [148]. También se ha reportado que inhibidores de catepsina L evitan la entrada del coronavirus del SARS y ha sido propuesto que su glicoproteína de cápside, la cual activa la fusión de las membranas viral y endosomal es procesada por la misma catepsina [149]. Otro caso es el de virus de Nipah en el que la activación de su proteína de fusión, la cual se requiere para su propagación de célula a célula, es mediada por la catepsina B [150].

Aunque los resultados mostrados en este trabajo indican que las catepsinas son importantes en la entrada de varias cepas de rotavirus (Figs. 12 y 13), aún se desconoce si la actividad de estas proteasas ocurre sobre algún factor viral, celular o ambos. Sin embargo, debido a que péptidos provenientes de las proteínas VP4 y VP7, incluyendo péptidos obtenidos al tratar a estas proteínas con proteasas, tienen la capacidad de permeabilizar liposomas y membranas celulares [48, 151-153], no se descarta que el papel de las catepsinas en la entrada de los rotavirus pudiera residir en procesar sus proteínas de cápside para facilitar la permeabilización y/o ruptura de la membrana endosomal, para poder alcanzar el citoplasma y continuar con su ciclo de replicación. Independientemente de cuál sea el preciso papel de las catepsinas en la entrada de los rotavirus, este es el primer trabajo donde se demuestra su relevancia en dicho proceso.

Asimismo, los resultados obtenidos con los rearreglantes UKxRRV indican que el fenotipo de sensibilidad al silenciamiento de la expresión de Rab7, Rab9a y CD-M6PR del rotavirus UK correlaciona con su proteína VP4 (Figs. 9B, 9C y 10B), al igual que el fenotipo de infectividad dependiente de CHC (Fig. 6A y 6C). Los datos obtenidos con los virus variantes de RRV, Nar3 y sus revertantes, sorpresivamente también indican que su tráfico vesicular se asocia con la naturaleza de su proteína VP4.

Se ha propuesto que después de la internalización en la célula mediante endocitosis, una disminución en el calcio endosomal resulta en el desensamble de la capa proteica externa de la cápside de los rotavirus, generando la DLP que posterior a la ruptura de la membrana endosomal alcanzará el citoplasma para continuar con su ciclo de replicación [152]. Además, se ha demostrado en ensayos *in vitro* que la cepa de rotavirus RRV pierde la capa externa de la cápside para rendir DLPs en concentraciones alrededor de 10-20 nM de calcio, mientras que la cepa UK pierde dicha capa en una concentración de 600 nM del mismo ión [61]. Tomando en cuenta que la concentración de calcio disminuye con la maduración progresiva de los compartimentos endosomales [154], se podría esperar que la cepa de rotavirus UK perdiera la capa externa en endosomas tempranos, mientras que RRV la perdería en endosomas tardíos. Sin embargo, mientras que se ha demostrado que RRV requiere llegar hasta ME para infectar a las células [4], los resultados de este trabajo indican que UK requiere llegar hasta endosomas tardíos, y que el tráfico vesicular de estas cepas está determinado por su proteína VP4. Lo anterior sugiere que la pérdida de la capa externa dentro de las células es un proceso más complejo que el observado en experimentos *in vitro*, donde además de depender de la concentración de calcio, posiblemente también depende de pH y de factores celulares, entre ellos las catepsinas. Los datos también sugieren que el papel de la proteína VP7 durante la endocitosis y tráfico vesicular de los rotavirus pudiera ser menor o prescindible, no importando el origen viral de esta proteína, al menos para el caso de las cepas RRV y UK.

Finalmente, los resultados de este trabajo en conjunto indican que la proteína VP4 de los rotavirus RRV y UK tiene un papel determinante en direccionar la entrada de los rotavirus mediante diferentes vías de endocitosis. Indican también que la proteína VP4 es el único factor viral que correlaciona con el tráfico vesicular diferencial observado entre estas cepas de rotavirus. Este trabajo además aporta la identificación de diferentes catepsinas como factores celulares relevantes en la entrada de los rotavirus en células MA104. Todo lo anterior enriquece el conocimiento acerca de la entrada de los rotavirus en células MA104

mediante diferentes mecanismos de endocitosis y el tráfico vesicular diferencial observado, tópicos que hasta la fecha han sido poco explorados.

XIV. CONCLUSIONES

- 1.** La proteína VP4 es el único factor viral involucrado en dirigir la endocitosis mediada por clatrina del rotavirus UK.
- 2.** El único factor viral involucrado en dirigir la endocitosis atípica de RRV es su proteína VP4.
- 3.** El cambio puntual en el aminoácido 187 (K187R), localizado en la región de hemaglutinación del rotavirus RRV, determina la vía de endocitosis (dependiente o independiente de clatrina) utilizada por el virus.
- 4.** Los ensayos de RNAi, en conjunto con el uso de neuraminidasa o glicoforina A, indican que la interacción de VP8 con ácidos siálicos terminales no es necesaria para la infectividad de Nar3 dependiente de clatrina, y sugieren que la interacción de VP5 con alguna de las moléculas con las que interacciona en la superficie celular podría ser importante en dicho fenotipo.
- 5.** Diferentes cepas de rotavirus que reconocen diferentes receptores celulares pueden ingresar en la célula mediante endocitosis mediada por clatrina.
- 6.** Los ensayos de RNAi para apagar la expresión de Rab7 y Rab9a indican que el tráfico vesicular de los rotavirus ocurre de manera diferencial: UK, Wa, WI61, DS-1, YM y Nar3 requieren llegar a endosomas tardíos para infectar a las células, mientras que SA11-4S y RRV sólo requieren llegar a endosomas tempranos pero no a endosomas tardíos.
- 7.** El tráfico vesicular diferencial de UK y RRV está relacionado con la proteína VP4.
- 8.** La endocitosis mediada por clatrina compartida por diferentes cepas de rotavirus no determina su tráfico vesicular.
- 9.** Con excepción de Nar3, las cepas de rotavirus que llegan a endosomas tardíos requieren, además del CD-M6PR, de catepsinas, cuyo transporte depende de este receptor intraluminal.

XV. PERSPECTIVAS

- 1)** Estudiar si la endocitosis atípica de RRV pudiera estar ligada al genotipo P[3].
- 2)** Determinar los factores virales involucrados en la endocitosis y tráfico vesicular de las cepas de rotavirus SA11-4S, Wa, WI-61, DS-1 y YM.
- 3)** Estudiar el papel del calcio en el tráfico vesicular e infectividad de los rotavirus.
- 4)** Identificar los receptores celulares que activan los mecanismos de endocitosis en células MA104 de las diferentes cepas de rotavirus.
- 5)** Estudiar el papel específico de las catepsinas en la entrada de los rotavirus.
- 6)** Evaluar el potencial papel de las vías de transporte independientes de CD-M6PR en la infectividad de los rotavirus que requieren llegar a endosomas tardíos.
- 7)** Estudiar los mecanismos de endocitosis y tráfico vesicular de los rotavirus en modelos experimentales de células polarizadas, de cultivos primarios de enterocitos y en cultivo de vellosidades provenientes de epitelio de intestino delgado.
- 8)** Evaluar el uso de fármacos inhibidores de catepsinas en modelos animales como posible alternativa terapéutica para la gastroenteritis aguda ocasionada por los rotavirus.

XVI. REFERENCIAS

1. Parashar, U.D., et al., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 565-72.
2. Gutiérrez, M., et al., *Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9161-9.
3. Sánchez-San Martín, C., et al., *Characterization of rotavirus cell entry*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2310-8.
4. Silva-Ayala, D., et al., *Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(25): p. 10270-5.
5. Silva-Ayala, D., *Identificación de proteínas celulares necesarias en la infección por rotavirus utilizando genómica funcional. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México. 2014.*
6. WHO, *Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013*. Wkly Epidemiol Rec, 2013. **88**(5): p. 49-64.
7. Parashar, U.D., et al., *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(2): p. 304-6.
8. Parashar, U., et al., *Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(2): p. 113-7.
9. Tate, J.E., et al., *2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(2): p. 136-41.
10. Estes, M.K.K., A. Z., *Chapter 57: Rotaviruses.*, in *Fields Virology*, D.M.H. Knipe, Peter M., Editor 2007. p. 1918-74.
11. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. Virus Res, 2004. **101**(1): p. 67-81.
12. López, S. and C.F. Arias, *Early steps in rotavirus cell entry*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **309**: p. 39-66.
13. Matthijnssens, J., et al., *Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments*. Arch Virol, 2008. **153**(8): p. 1621-9.
14. Matthijnssens, J., et al., *Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)*. Arch Virol, 2011. **156**(8): p. 1397-413.
15. Liu, Y., et al., *Rotavirus VP8*: phylogeny, host range and interaction with HBGAs*. J Virol, 2012. **86**(18): p. 9899-910.
16. Kalica, A.R., J. Flores, and H.B. Greenberg, *Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation*. Virology, 1983. **125**(1): p. 194-205.

17. Arias, C.F., M. Lizano, and S. López, *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)**: p. 633-42.
18. Mackow, E.R., et al., *The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant*. J Virol, 1989. **63**(4): p. 1661-8.
19. Lizano, M., S. Lopez, and C.F. Arias, *The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1383-91.
20. Ludert, J.E., et al., *Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 487-93.
21. Estes, M.K., D.Y. Graham, and B.B. Mason, *Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms*. J Virol, 1981. **39**(3): p. 879-88.
22. Konno, T., et al., *Proteolytic enhancement of human rotavirus infectivity*. Clin Infect Dis, 1993. **16 Suppl 2**: p. S92-7.
23. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
24. Prasad, B.V., et al., *Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 476-9.
25. Shaw, A.L., et al., *Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure*. Cell, 1993. **74**(4): p. 693-701.
26. Yeager, M., et al., *Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis*. EMBO J, 1994. **13**(5): p. 1011-8.
27. Tihova, M., et al., *Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry*. J Mol Biol, 2001. **314**(5): p. 985-92.
28. Dormitzer, P.R., et al., *Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus*. Nature, 2004. **430**(7003): p. 1053-8.
29. Li, Z., et al., *Rotavirus architecture at subnanometer resolution*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1754-66.
30. Settembre, E.C., et al., *Atomic model of an infectious rotavirus particle*. EMBO J, 2011. **30**(2): p. 408-16.
31. López, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. Trends Microbiol, 2004. **12**(6): p. 271-8.
32. Fiore, L., H.B. Greenberg, and E.R. Mackow, *The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin*. Virology, 1991. **181**(2): p. 553-63.
33. Fuentes-Panana, E.M., et al., *Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2629-32.
34. Dormitzer, P.R., et al., *The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 885-97.
35. Isa, P., C.F. Arias, and S. López, *Role of sialic acids in rotavirus infection*. Glycoconj J, 2006. **23**(1-2): p. 27-37.

36. Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno, *Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption*. *Virology*, 1989. **172**(1): p. 196-205.
37. Méndez, E., C.F. Arias, and S. López, *Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture*. *J Virol*, 1993. **67**(9): p. 5253-9.
38. Ciarlet, M., et al., *Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin*. *J Virol*, 2002. **76**(8): p. 4087-95.
39. Ciarlet, M. and M.K. Estes, *Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity*. *J Gen Virol*, 1999. **80**: p. 943-8.
40. Delorme, C., et al., *Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope*. *J Virol*, 2001. **75**(5): p. 2276-87.
41. Haselhorst, T., et al., *STD NMR spectroscopy and molecular modeling investigation of the binding of N-acetylneuraminic acid derivatives to rhesus rotavirus VP8* core*. *Glycobiology*, 2007. **17**(1): p. 68-81.
42. Haselhorst, T., et al., *Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(2): p. 91-3.
43. Hu, L., et al., *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. *Nature*, 2012. **485**(7397): p. 256-9.
44. Huang, P., et al., *Spike Protein VP8* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner*. *J Virol*, 2012. **86**(9): p. 4833-43.
45. Ramani, S., et al., *The VP8* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans*. *J Virol*, 2013. **87**(13): p. 7255-64.
46. Liu, Y., et al., *Poly-LacNAc as an Age-Specific Ligand for Rotavirus P[11] in Neonates and Infants*. *Plos One*, 2013. **8**(11): p. e78113.
47. Golantsova, N.E., E.E. Gorbunova, and E.R. Mackow, *Discrete domains within the rotavirus VP5* direct peripheral membrane association and membrane permeability*. *J Virol*, 2004. **78**(4): p. 2037-44.
48. Dowling, W., et al., *Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain*. *J Virol*, 2000. **74**(14): p. 6368-76.
49. Kim, I.S., et al., *Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry*. *J Virol*, 2010. **84**(12): p. 6200-7.
50. Coulson, B.S., S.L. Londrigan, and D.J. Lee, *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**(10): p. 5389-94.
51. Hewish, M.J., Y. Takada, and B.S. Coulson, *Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells*. *J Virol*, 2000. **74**(1): p. 228-36.
52. Zárate, S., et al., *Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3*. *Virology*, 2000. **278**(1): p. 50-4.

53. Graham, K.L., et al., *Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 12): p. 3397-408.
54. Zárate, S., et al., *Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7254-60.
55. Gualtero, D.F., et al., *Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection*. Arch Virol, 2007. **152**(12): p. 2183-96.
56. Dormitzer, P.R. and H.B. Greenberg, *Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7*. Virology, 1992. **189**(2): p. 828-32.
57. Dormitzer, P.R., H.B. Greenberg, and S.C. Harrison, *Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers*. Virology, 2000. **277**(2): p. 420-8.
58. Trask, S.D. and P.R. Dormitzer, *Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11293-304.
59. Aoki, S.T., et al., *Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab*. Science, 2009. **324**(5933): p. 1444-7.
60. Chen, D. and R.F. Ramig, *Rescue of infectivity by in vitro transcapsidation of rotavirus single-shelled particles*. Virology, 1993. **192**(2): p. 422-9.
61. Ruiz, M.C., et al., *The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 4877-83.
62. Graham, K.L., 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**(18): p. 9969-78.
63. Zárate, S., et al., *VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10839-47.
64. Ramig, R.F., *Genetics of the rotaviruses*. Annu Rev Microbiol, 1997. **51**: p. 225-55.
65. Quan, C.M. and F.W. Doane, *Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis*. Intervirology, 1983. **20**(4): p. 223-31.
66. Ludert, J.E., et al., *Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells*. Intervirology, 1987. **27**(2): p. 95-101.
67. Wolf, M., P.T. Vo, and H.B. Greenberg, *Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes*. J Virol, 2011. **85**(6): p. 2492-503.
68. Yu, X., et al., *Structural basis of rotavirus strain preference toward N-acetyl- or N-glycolylneuraminic acid-containing receptors*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13456-66.
69. Colarow, L., et al., *Characterization and biological activity of gangliosides in buffalo milk*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1631**(1): p. 94-106.
70. Haselhorst, T., et al., *Recognition of the GM3 ganglioside glycan by Rhesus rotavirus particles*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(5): p. 1055-8.

71. Yu, X., et al., *Novel structural insights into rotavirus recognition of ganglioside glycan receptors*. J Mol Biol, 2011. **413**(5): p. 929-39.
72. Martinez, M.A., et al., *Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry*. J Virol, 2013. **87**(2): p. 1115-22.
73. Guerrero, C.A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14644-9.
74. Ciarlet, M., et al., *VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment*. J Virol, 2002. **76**(3): p. 1109-23.
75. Londrigan, S.L., et al., *Monkey rotavirus binding to alpha2beta1 integrin requires the alpha2 I domain and is facilitated by the homologous beta1 subunit*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9486-501.
76. Graham, K.L., et al., *Effects on rotavirus cell binding and infection of monomeric and polymeric peptides containing alpha2beta1 and alphaxbeta2 integrin ligand sequences*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11786-97.
77. Graham, K.L., Y. Takada, and B.S. Coulson, *Rotavirus spike protein VP5* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 5): p. 1275-83.
78. Realpe, M., et al., *Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells*. Virus Res, 2010. **147**(2): p. 231-41.
79. Fleming, F.E., et al., *Determinants of the specificity of rotavirus interactions with the alpha2beta1 integrin*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6165-74.
80. Santana, A.Y., C.A. Guerrero, and O. Acosta, *Implication of Hsc70, PDI and integrin alphavbeta3 involvement during entry of the murine rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice*. Arch Virol, 2013. **158**(6): p. 1323-36.
81. Guerrero, C.A., et al., *Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4096-102.
82. Perez-Vargas, J., et al., *The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3322-31.
83. Calderon, M.N., et al., *Inhibiting Rotavirus Infection by Membrane-Impermeant Thiol/Disulfide Exchange Blockers and Antibodies against Protein Disulfide Isomerase*. Intervirology, 2012. **55**(6): p. 451-64.
84. Willoughby, R.E., R.H. Yolken, and R.L. Schnaar, *Rotaviruses specifically bind to the neutral glycosphingolipid asialo-GM1*. J Virol, 1990. **64**(10): p. 4830-5.
85. Srnka, C.A., et al., *Cell surface ligands for rotavirus: mouse intestinal glycolipids and synthetic carbohydrate analogs*. Virology, 1992. **190**(2): p. 794-805.
86. Superti, F. and G. Donelli, *Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 10)**: p. 2467-74.
87. Fleming, F.E., et al., *Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha 2 beta 1 and alpha 4 beta 1*. Arch Virol, 2007. **152**(6): p. 1087-101.
88. Fleming, F.E., et al., *Relative roles of GM1 ganglioside, N-acylneuraminic acids and alpha2beta1 integrin in mediating rotavirus infection*. J Virol, 2014.

89. Méndez, E., et al., *Entry of rotaviruses is a multistep process*. *Virology*, 1999. **263**(2): p. 450-9.
90. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(8): p. 603-12.
91. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(8): p. 517-33.
92. Tsai, B., *Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 23-43.
93. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(3): p. 185-94.
94. Sapp, M. and P.M. Day, *Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses*. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 400-9.
95. Yamauchi, Y. and A. Helenius, *Virus entry at a glance*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 6): p. 1289-95.
96. Sarantis, H. and S. Grinstein, *Subversion of phagocytosis for pathogen survival*. *Cell Host Microbe*, 2012. **12**(4): p. 419-31.
97. Vassilieva, E.V. and A. Nusrat, *Vesicular trafficking: molecular tools and targets*. *Methods Mol Biol*, 2008. **440**: p. 3-14.
98. Stenmark, H., *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(8): p. 513-25.
99. Vanlandingham, P.A. and B.P. Ceresa, *Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(18): p. 12110-24.
100. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular body morphogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012. **28**: p. 337-62.
101. Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr, *The ESCRT pathway*. *Dev Cell*, 2011. **21**(1): p. 77-91.
102. Lombardi, D., et al., *Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network*. *EMBO J*, 1993. **12**(2): p. 677-82.
103. Barbero, P., L. Bittova, and S.R. Pfeffer, *Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(3): p. 511-8.
104. Riederer, M.A., et al., *Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network*. *J Cell Biol*, 1994. **125**(3): p. 573-82.
105. Ganley, I.G., et al., *Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(12): p. 5420-30.
106. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. *EMBO J*, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
107. Dahms, N.M., L.J. Olson, and J.J. Kim, *Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors*. *Glycobiology*, 2008. **18**(9): p. 664-78.
108. Ghosh, P., N.M. Dahms, and S. Kornfeld, *Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(3): p. 202-12.

109. Lozach, P.Y., J. Huotari, and A. Helenius, *Late-penetrating viruses*. *Curr Opin Virol*, 2011. **1**(1): p. 35-43.
110. Gutiérrez, M., *Caracterización de la vía de entrada de la cepa humana de rotavirus Wa*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM. 2007.
111. Gutiérrez, M., *Caracterización de la vía de entrada de los rotavirus*. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM. 2011.
112. Wolf, M., E.M. Deal, and H.B. Greenberg, *Rhesus rotavirus trafficking during entry into MA104 cells is restricted to the early endosome compartment*. *J Virol*, 2012. **86**(7): p. 4009-13.
113. Grove, J. and M. Marsh, *The cell biology of receptor-mediated virus entry*. *J Cell Biol*, 2011. **195**(7): p. 1071-82.
114. Feng, N., et al., *Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts*. *J Virol*, 2009. **83**(14): p. 6987-94.
115. Méndez, E., C.F. Arias, and S. López, *Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus*. *J Virol*, 1996. **70**(2): p. 1218-22.
116. Ruíz, A.M., et al., *Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype*. *J Virol*, 1988. **62**(11): p. 4331-6.
117. Pando, V., et al., *Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection*. *Virology*, 2002. **295**(1): p. 190-200.
118. Cuadras, M.A., C.F. Arias, and S. Lopez, *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**(12): p. 9065-74.
119. Diaz-Salinas, M.A., et al., *The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells*. *J Virol*, 2013. **87**(3): p. 1658-63.
120. Heuser, J.E. and R.G. Anderson, *Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation*. *J Cell Biol*, 1989. **108**(2): p. 389-400.
121. Hansen, S.H., K. Sandvig, and B. van Deurs, *Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification*. *J Cell Biol*, 1993. **121**(1): p. 61-72.
122. Bass, D.M., et al., *Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(6): p. 2313-20.
123. Ludert, J.E., et al., *Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection*. *J Gen Virol*, 1998. **79**: p. 725-9.
124. Zárate, S., et al., *The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells*. *J Virol*, 2000. **74**(2): p. 593-9.
125. Gahmberg, C.G., M. Autero, and J. Hermonen, *Major O-glycosylated sialoglycoproteins of human hematopoietic cells: differentiation antigens with poorly understood functions*. *J Cell Biochem*, 1988. **37**(1): p. 91-105.
126. Spence, L., et al., *Comparison of rotavirus strains by hemagglutination inhibition*. *Can J Microbiol*, 1978. **24**(4): p. 353-62.

127. Mainou, B.A. and T.S. Dermody, *Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection*. J Virol, 2012. **86**(16): p. 8346-58.
128. Boulant, S., et al., *Similar uptake but different trafficking and escape routes of reovirus virions and infectious subviral particles imaged in polarized Madin-Darby canine kidney cells*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(8): p. 1196-207.
129. Anafu, A.A., et al., *Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry*. J Biol Chem, 2013. **288**(24): p. 17261-71.
130. Mainou, B.A., et al., *Reovirus cell entry requires functional microtubules*. MBio, 2013. **4**(4).
131. Ebert, D.H., et al., *Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24609-17.
132. Golden, J.W., et al., *Cathepsin S supports acid-independent infection by some reoviruses*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8547-57.
133. Danthi, P., et al., *From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **343**: p. 91-119.
134. Díaz-Salinas, M.A., et al., *Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell*. J Virol, 2014.
135. Lévêque, N., et al., *Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway*. Virus Res, 2007. **130**(1-2): p. 1-9.
136. Sobo, K., et al., *Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells*. J Virol, 2011. **85**(23): p. 12376-86.
137. Stuart, A.D., et al., *A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9307-22.
138. Stuart, A.D., et al., *Determination of the structure of a decay accelerating factor-binding clinical isolate of echovirus 11 allows mapping of mutants with altered receptor requirements for infection*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7694-704.
139. Chung, S.K., et al., *Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells*. Virology, 2005. **333**(1): p. 31-40.
140. Patel, K.P., C.B. Coyne, and J.M. Bergelson, *Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells*. J Virol, 2009. **83**(21): p. 11064-77.
141. Pan, J., et al., *Single amino acid changes in the virus capsid permit coxsackievirus B3 to bind decay-accelerating factor*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7436-43.
142. Berryman, S., et al., *Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8519-34.
143. O'Donnell, V., et al., *Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8506-18.
144. O'Donnell, V., M. Larocco, and B. Baxt, *Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9075-85.

145. Coutinho, M.F., M.J. Prata, and S. Alves, *A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway*. Mol Genet Metab, 2012. **107**(3): p. 257-66.
146. Chia, P.Z., P. Gunn, and P.A. Gleeson, *Cargo trafficking between endosomes and the trans-Golgi network*. Histochem Cell Biol, 2013. **140**(3): p. 307-15.
147. Chandran, K., et al., *Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1643-5.
148. Cote, M., et al., *Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 344-8.
149. Simmons, G., et al., *Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(33): p. 11876-81.
150. Diederich, S., et al., *Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3736-45.
151. Charpilienne, A., et al., *Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 6)**: p. 1367-71.
152. Ruiz, M.C., et al., *Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 11)**: p. 2883-93.
153. Denisova, E., et al., *Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3147-53.
154. Scott, C.C. and J. Gruenberg, *Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH*. Bioessays, 2011. **33**(2): p. 103-10.

XVII. ANEXO 1

Artículo publicado en “Journal of Virology”:

“The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells”.

The Spike Protein VP4 Defines the Endocytic Pathway Used by Rotavirus To Enter MA104 Cells

Marco A. Díaz-Salinas, Pedro Romero, Rafaela Espinosa,
Yasutaka Hoshino, Susana López and Carlos F. Arias
J. Virol. 2013, 87(3):1658. DOI: 10.1128/JVI.02086-12.
Published Ahead of Print 21 November 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jvi.asm.org/content/87/3/1658>

| | |
|-----------------------|--|
| | <i>These include:</i> |
| REFERENCES | This article cites 54 articles, 39 of which can be accessed free at: http://jvi.asm.org/content/87/3/1658#ref-list-1 |
| CONTENT ALERTS | Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more» |

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

The Spike Protein VP4 Defines the Endocytic Pathway Used by Rotavirus To Enter MA104 Cells

Marco A. Díaz-Salinas,^a Pedro Romero,^a Rafaela Espinosa,^a Yasutaka Hoshino,^b Susana López,^a Carlos F. Arias^a

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, México^a; Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA^b

Rotaviruses are internalized into MA104 cells by endocytosis, with different endocytic pathways used depending on the virus strain. The bovine rotavirus UK strain enters cells through a clathrin-mediated endocytic process, while the simian rhesus rotavirus (RRV) strain uses a poorly defined endocytic pathway that is clathrin and caveolin independent. The viral surface protein VP7 and the spike protein VP4 interact with cellular receptors during cell binding and penetration. To determine the viral protein that defines the mechanism of internalization, we used a panel of UK × RRV reassortant viruses having different combinations of the viral structural proteins. Characterization of the infectivities of these reassortants in MA104 cells either transfected with a small interfering RNA (siRNA) against the heavy chain of clathrin or incubated with hypertonic medium that destabilizes the clathrin coat clearly showed that VP4 determines the pathway of virus entry. Of interest, the characterization of Nar3, a sialic acid-independent variant of RRV, showed that a single amino acid change in VP4 shifts the route of entry from being clathrin dependent to clathrin independent. Furthermore, characterizations of several additional rotavirus strains that differ in their use of cellular receptors showed that all entered cells by clathrin-mediated endocytosis, suggesting that diverse VP4-cell surface interactions can lead to rotavirus cell entry through this endocytic pathway.

Rotaviruses are the principal worldwide etiologic agents of severe viral gastroenteritis in infants and children, causing more than half a million deaths every year (1). These viruses belong to the family *Reoviridae* and, as such, are nonenveloped and have a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA that encodes six structural proteins (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural proteins (NSP1 to NSP6). The virus particles are formed by three concentric layers of proteins. The innermost layer is made up of VP2, which together with the viral genome and small amounts of VP1 and VP3 forms the core of the particle. The intermediate layer is formed by VP6, and the outermost layer is composed of trimers of the VP7 glycoprotein that form the smooth surface of the virus, from which the VP4 trimers that form the viral spikes project, thus forming the mature infectious triple-layered particles (TLPs) (2). Trypsin treatment of rotavirus is essential for virus cell entry; what results is the specific cleavage of VP4 to yield the cleavage products VP8 and VP5 (3–7). Analysis of the crystal structure of these domains has shown that VP8 forms the head, while VP5 forms the body and foot of the VP4 spike (8, 9).

Several cell molecules thought to function as virus receptors have been shown to interact with the virus surface proteins during the early steps of virus infection (10). VP7 binds integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha x\beta 2$ (11, 12), while VP5 has a conserved Asp-Gly-Glu (DGE) binding motif for integrin $\alpha 2\beta 1$ (11, 13–16) and also interacts with heat shock cognate protein 70 (hsc70) (17, 18). While the interaction with integrins has been reported to be strain dependent, all viruses tested have been shown to require hsc70 for cell infection (19). The VP8 domain of some virus strains contains a binding domain for terminal sialic acid (SA) (20) that is used for cell attachment of the virus. The infectivities of these viruses are thus inhibited by treatment of the cell with neuraminidase (NA); these are referred to as NA-sensitive strains (21). In contrast, most virus strains are NA resistant (22, 23), and it was recently shown that the VP8 domain of NA-resistant rotaviruses can interact with subterminal SA, which is not susceptible to cleavage by NA, or

with carbohydrate moieties related to human blood antigens (24–28). The initial interaction of NA-sensitive viruses with SA has been shown to be nonessential, since variants with a single amino acid change in the SA-binding domain of VP8, which bypass the VP8-SA interaction step, can be isolated (29–31). In the case of the NA-sensitive rhesus rotavirus (RRV), its NA-resistant variant Nar3 has been shown to attach to cells directly by interacting with integrin $\alpha 2\beta 1$ (15, 16).

Ultimately, the interactions described are believed to lead to rotavirus internalization by endocytosis (19, 32–34). Rotaviruses can be internalized into MA104 cells using different endocytic pathways depending on the virus strain. Bovine rotavirus strain UK, an integrin-independent NA-resistant strain that seems to attach to subterminal SA, enters cells by clathrin-mediated endocytosis, while the integrin-dependent NA-sensitive simian rotavirus strain RRV uses a poorly defined endocytic pathway that is different from macropinocytosis and is independent of clathrin and caveolin but depends on dynamin II, the small GTPases RhoA and Cdc42, actinin-4, and the presence of cholesterol on the cell surface (19, 32) (D. Silva-Ayala, M. Gutiérrez, T. López, N. Perrimon, S. López, and C. F. Arias, submitted for publication).

Given the ample differences observed among rotavirus strains in regard to receptor usage and the two cell entry pathways described above, in this study we sought a better understanding of the strain-dependent variations in the rotavirus entry process by determining whether there are strain-dependent differences in clathrin dependence during entry, which of the two outer-layer proteins determine

Received 9 August 2012 Accepted 13 November 2012

Published ahead of print 21 November 2012

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

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.02086-12

this choice, and whether the choice is dictated by the type of glycans used during initial attachment. Using a collection of UK × RRV reassortant viruses, we found that the spike protein VP4 is sufficient to define the endocytic pathway used. In addition, characterization of the RRV Nar3 mutant showed that a single amino acid change in VP4 can shift clathrin-dependent endocytosis to a different endocytic route. By testing different rotavirus strains, we also showed that diverse virus-cell surface interactions can all lead to rotavirus cell entry through clathrin-mediated endocytosis.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and viruses. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 (ATCC) was grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 4% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The simian rotavirus strain RRV (G3P[3]), bovine rotavirus strain UK (G6P[5]), and rotavirus reassortants UK × RRV used in this work, with the exception of reassortant 85-2, have been described previously (35). Reassortant 85-2 was generated using the same procedure used for the other UK × RRV reassortants (35). RRV variant Nar3 and its revertant clones 14 and 18 (rNar3-14 and rNar3-18) have been described previously (31, 36). Simian rotavirus strain SA11-4S (clone 3) (G3P[2]) was obtained from M. K. Estes (Baylor College of Medicine, Houston, TX). Human rotavirus strains Wa (G1P[8]) and DS-1 (G2P[4]) were obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), and rotavirus WI-61 (G9P[8]) was obtained from F. H. Clark (Wistar Institute, Philadelphia, PA; through M. K. Estes). The porcine strain YM (G11P[7]) was isolated in our laboratory (37). All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as described previously (38). Rotavirus cell lysates were activated with trypsin (10 μg/ml) for 30 min at 37°C.

Reagents and antibodies. Sucrose, EGTA, neuraminidase (NA) from *Arthrobacter ureafaciens*, and glycoprotein A (GpA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Trypsin was purchased from Gibco-BRL. The small interfering RNA (siRNA) against the luciferase gene and the SMARTpool siRNA against the clathrin heavy chain (CHC) were purchased from Dharmacon Research (Lafayette, CO). A monoclonal antibody (MAb) to CHC was purchased from Thermo Fisher Scientific (USA). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal and anti-mouse antibodies were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). The goat and rabbit polyclonal sera, raised against purified rotavirus TLPs, and the rabbit anti-vimentin serum against recombinant vimentin (α-Vim) were produced in our laboratory.

Cell treatments. Transfection of siRNAs into MA104 cells was performed in 96-well plates using a reverse transfection method as described previously (19). For the sucrose cell treatment, confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM and pretreated with 250 mM sucrose as described previously (19). For NA cell treatment, confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were washed twice with MEM and pretreated with 80 mU/ml of *A. ureafaciens* NA as described previously (36). After activation with trypsin, the viral cell lysates were incubated with GpA for 30 min at a final concentration of 10 μg/ml as described previously (36), and this mixture was used to infect cells.

Infectivity assays. MA104 cells were washed twice with MEM and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.02 using cell lysates of the indicated rotavirus strain. After 1 h of adsorption, the virus was removed, and the cells were washed twice and incubated with MEM for 14 additional hours. The cell monolayers were fixed, and the infected cells were revealed by an immunoperoxidase focus detection assay as described previously (38). In the sucrose infectivity assays, after the adsorption period and before washing the cells with MEM, the cells were washed twice with EGTA-phosphate-buffered saline (PBS) as described previously (19). When a combined approach was used, cells were transfected with the indicated siRNA and subsequently treated with NA.

TABLE 1 Capsid proteins of UK × RRV reassortants employed in this study

| Virus | Origin of ^a : | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | VP1 | VP3 | VP2 | VP6 | VP7 | VP4 |
| UK | U | U | U | U | U | U |
| RRV | R | R | R | R | R | R |
| UK × RRV rotavirus reassortants | | | | | | |
| 9 (9-8-1) ^b | U | U | U | U | R | U |
| 13 (13-1-1) | R | R | R | U | R | R |
| 19 (19-1-1) | R | R | R | R | R | U |
| 20 (20-1-1) | U | U | R | R | U | U |
| 21 (21-1-1) | U | U | U | R | U | U |
| 25 (25-2-1) | R | R | R | U | R | R |
| 27 (27-2-1) | R | R | R | U | R | R |
| 85 (85-2) | U | R | R | R | U | R |

^a U indicates that the protein is of UK origin, and R indicates that the protein is of RRV origin.

^b Numbers in parentheses are the original reported names of the reassortant viruses 35.

Binding assays. MA104 cells grown in 96-well plates and transfected with siRNAs were treated with NA as described above; the cells were then washed twice and incubated with MEM for 30 min at 37°C, and virus binding was assayed as described previously (39).

Immunoblots. Cells were lysed in Laemmli sample buffer and denatured by boiling for 5 min. The cell lysates were then subjected to SDS-10% PAGE and transferred to Immobilon NC (Millipore) membranes. The membranes were processed for immunoblotting as described previously (19).

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated by using a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's multiple-comparison posttest using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). *P* values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

VP4 defines the clathrin-dependent internalization of bovine rotavirus strain UK. Rotavirus strain UK enters cells by clathrin-mediated endocytosis, while the simian rotavirus strain RRV uses an as-yet-undefined endocytic pathway. As an initial approach to identifying which viral protein is associated with the endocytic pathway used by these viruses, we evaluated the sensitivities of a collection of UK × RRV rotavirus reassortants having different combinations of structural proteins (Table 1) to cell treatments known to impair clathrin-mediated endocytosis. Treatment of cells with a hypertonic medium (250 mM sucrose) results in the dissociation of clathrin vesicles from the plasma membrane (40, 41). As reported previously (19), the infectivity of RRV was not affected under these conditions, while the infectivity of UK decreased by about 40%. Of interest, the infectivities of reassortants that have the VP4 protein from the bovine rotavirus (reassortants 9, 19, 20, and 21) also decreased to about the same level, while the infectivities of reassortants that contain the VP4 protein of RRV (viruses 13, 25, 27, and 85) were not affected (Fig. 1). These results strongly suggest that VP4 is the protein that confers sensitivity to hypertonic medium.

To confirm the previous results, we evaluated the infectivity of the panel of UK × RRV reassortants in MA104 cells in which the expression of the clathrin heavy chain (CHC) was knocked down by RNA interference (RNAi). In these assays, the infectivity of rotavirus strain UK was inhibited by about 75% in cells transfected with the siRNA against CHC compared to cells transfected with an irrelevant siRNA, while the infectivity of RRV remained

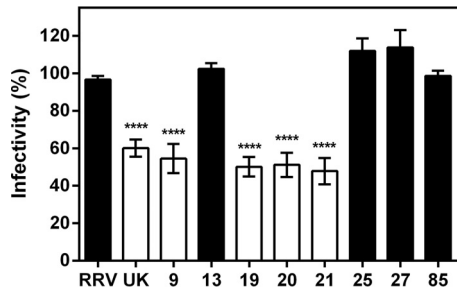


FIG 1 Effect of hypertonic medium on the infectivities of the UK × RRV reassortants. MA104 cells were incubated with sucrose at 250 mM in MEM for 10 min at 37°C before they were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02 for 1 h at 37°C in the presence of the same hypertonic medium. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed twice with 5 mM EGTA, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. The infected cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus observed in nontreated cells, which represent 100% infectivity. Black bars, RRV and reassortants bearing RRV VP4; white bars, UK and reassortants bearing UK VP4. The arithmetic means ± standard deviation of three independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivity of each virus in mock- and sucrose-treated cells ($P \leq 0.001$).

unaffected (Fig. 2A), as described previously (19). The infectivities of the reassortant viruses with the VP4 protein of UK origin (reassortants 9, 19, 20, and 21) were significantly decreased by this treatment, while reassortants 13, 25, 27, and 85, which have the VP4 of RRV, behaved like the RRV parental virus. Of particular interest, the infectivity of reassortant 19 that has a UK VP4 in an RRV capsid protein background was sensitive to CHC silencing. It

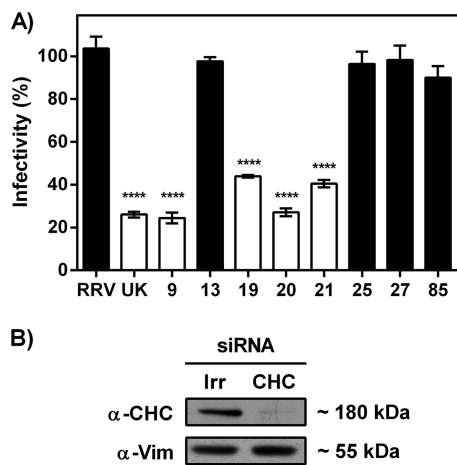


FIG 2 Infectivities of UK × RRV reassortants in CHC knocked-down cells. (A) MA104 cells transfected with a SMARTpool siRNA against the clathrin heavy chain (CHC) were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hours postinfection (hpi), the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to infection of cells transfected with an irrelevant siRNA (luciferase siRNA), which represents 100% infectivity. Black bars, RRV and reassortants bearing RRV VP4; white bars, UK and reassortants bearing UK VP4. The arithmetic means ± standard deviation of three independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivities of each virus in irrelevant and CHC siRNA-transfected cells ($P \leq 0.001$). (B) Representative immunoblot for determination of the abundance of CHC in MA104 cells transfected with either irrelevant or CHC siRNAs (Irr and CHC, respectively). Vimentin (Vim) was used as a loading control. The antibodies used are indicated.

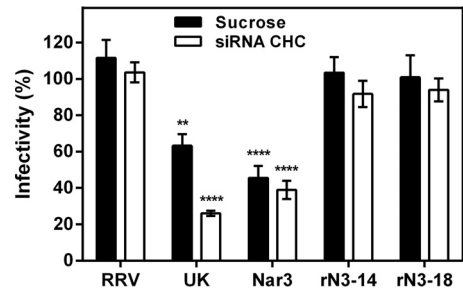


FIG 3 Effects of cell treatments that affect clathrin-dependent endocytosis on the infectivities of RRV variants. MA104 cells treated with sucrose or transfected with the siRNA against CHC were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. Cells were fixed and immunostained at 14 hpi as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to their infectivity under mock sucrose conditions or in cells transfected with an irrelevant siRNA. The arithmetic means ± standard deviation of three independent experiments performed in duplicate are shown. **, $P < 0.01$, and ****, $P \leq 0.0001$, for statistically significant differences between the infectivities of each virus under experimental and control conditions. Revertant viruses rNar3-14 and rNar3-18 are denoted as rN3-14 and rN3-18.

is also of note that even though there was not a single-gene reassortant virus with an RRV VP4 protein in a UK background, all reassortants with an RRV VP4 were resistant to CHC knockdown, suggesting that these viruses enter the cells through the endocytic pathway used by the parental RRV virus, guided by the spike protein VP4. To discard the possibility that silencing of CHC had affected the membrane surface availability of an unknown UK attachment receptor, we tested the binding of UK and RRV strains to MA104 cells transfected with the siRNA against CHC. The attachment of both rotavirus strains was not altered in these cells compared to control cells transfected with an irrelevant siRNA (data not shown). Altogether, these results indicate that UK VP4 alone is sufficient to direct the entry of rotavirus into MA104 cells through clathrin-mediated endocytosis.

A single amino acid change in VP4 defines the pathway of rotavirus cell entry. RRV binds to MA104 cells through the interaction of an SA-binding domain in VP8, located at the tip of the spike (9). This binding, however, is not essential for infectivity of the virus, since RRV variants that bypass this interaction and bind instead to cells by interacting with integrin $\alpha 2\beta 1$ through the VP5 domain of VP4 have been isolated (36). Sequence characterizations of these NA-resistant (Nar) variants showed the presence of three amino acid changes in VP4 with respect to the wild-type virus (L37P, K187R, and Y267C), while the RRV phenotypic reversion of the Nar mutants occurred through a single amino acid change (the genetic reversion of R187 back to K in the VP8 subunit of VP4) (31). To assess if a change in the cell surface molecule used by the virus to anchor to the cell surface might influence the cell entry pathway, we characterized the effect of hypertonic medium and CHC dependence on the infectivity of the RRV NA-resistant variant Nar3 and its NA-sensitive revertants. As shown in Fig. 3, the infectivity of Nar3 was inhibited to a level similar to that of rotavirus strain UK by both sucrose treatment and the siRNA against CHC, while the infectivities of the two revertant viruses, rNar3-14 and rNar3-18, remained unaffected. These results suggest that in contrast to its parental RRV strain, variant Nar3 enters MA104 cells through a clathrin-mediated pathway as a result of a single amino acid change in the VP8 domain of VP4.

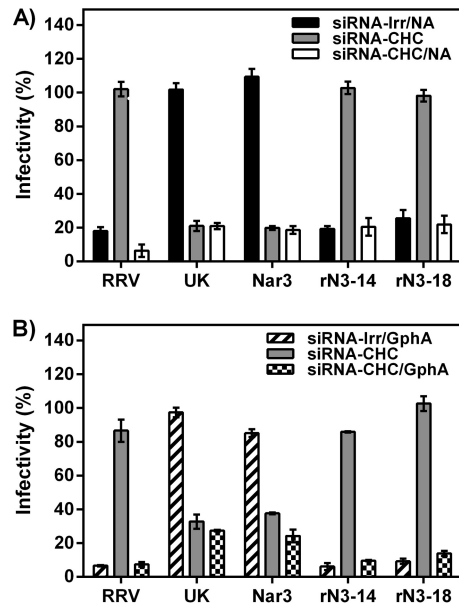


FIG 4 Effects of NA treatment and GphA on the infectivities of RRV variants in CHC-silenced cells. (A) MA104 cells transfected with an irrelevant siRNA or an siRNA against CHC were treated or not with NA (80 mU/ml for 1 h) and infected with the indicated RRV variants. Cells were fixed and immunostained at 14 hpi as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to its infectivity in cells transfected with the irrelevant siRNA but not treated with NA. (B) MA104 cells transfected with an irrelevant siRNA or an siRNA against CHC were infected with the indicated viruses that had been incubated with GphA. Cells were fixed and immunostained at 14 hpi as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to its infectivity in the absence of GphA in cells transfected with an irrelevant siRNA. The arithmetic means \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicate are shown. Revertant viruses rNar3-14 and rNar3-18 are denoted as rN3-14 and rN3-18.

The interaction of VP8 with sialic acid is not necessary for clathrin-dependent cell entry of Nar3. The cell attachment of Nar3 is mediated by the $\alpha 2\beta 1$ integrin-binding motif DGE, present in the VP5 domain of VP4 (15, 16). However, although Nar3 uses $\alpha 2\beta 1$ integrin instead of terminal SA to attach to MA104 cells, the VP8 domain of this RRV variant still maintains the ability to interact with SA residues (36). To evaluate the potential role of the VP8-SA interaction in the entry of rotavirus through clathrin-dependent endocytosis, we assayed the infectivities of RRV and Nar3 in cells treated with NA that had been previously transfected with the siRNA against CHC. As expected, the infectivity of RRV decreased in NA-treated cells transfected with an irrelevant siRNA or with the siRNA against CHC (Fig. 4A). The infectivity of Nar3, like that of UK, was inhibited only in MA104 cells in which the expression of CHC was knocked down, regardless of whether the cells had been treated with NA (Fig. 4A); the infectivities of the revertant viruses, rNar3-14 and rNar3-18, were similar to that of RRV under these conditions.

These results were confirmed by evaluating the infectivities of the viruses in the presence of GphA. This highly sialylated protein binds to the SA-binding domain of RRV and Nar3 but only inhibits the infectivity of the parental virus (36). As reported, in cells transfected with an irrelevant siRNA, preincubation with GphA decreased the infectivities of RRV and the Nar3 revertant viruses by more than 90%, while the infectivities of Nar3 and UK were not

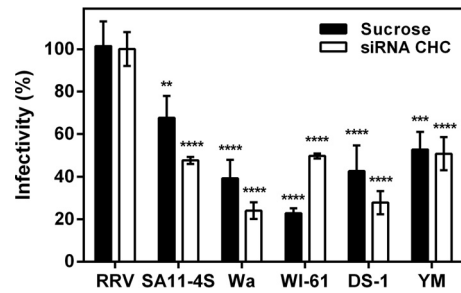


FIG 5 Infectivities of different rotavirus strains in cells with treatments that inhibited clathrin-mediated endocytosis. MA104 cells treated with sucrose or transfected with an siRNA against CHC were infected with the indicated rotavirus strains at an MOI of 0.02. At 14 hpi the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to their infectivities under mock sucrose conditions or in cells transfected with an irrelevant siRNA. The arithmetic means \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicate are shown. **, $P < 0.01$, ***, $P \leq 0.001$, and ****, $P \leq 0.0001$, for statistically significant differences between the infectivities of each virus under experimental and control conditions.

significantly affected (Fig. 4B). Of interest, the infectivity of Nar3 was inhibited by about 80% when the virus was preincubated with GphA and used to infect MA104 cells in which the expression of CHC had been silenced. These results indicate that despite having its VP8 domain blocked by GphA, the virus still enters the cell through a clathrin-dependent endocytosis route. The results also confirm that the entry through clathrin-mediated endocytosis is independent of the VP8-SA interaction and seems to be guided instead by the interaction of VP5 with integrin $\alpha 2\beta 1$ or by a subsequent virus-receptor interaction.

Rotavirus strains with different cell receptor requirements enter MA104 cells through a clathrin-mediated pathway. Since VP4 seems to be the protein responsible for the type of endocytosis that rotaviruses use to infect cells, it was of interest to investigate the mode of entry of rotavirus strains that bind to different cell surface molecules and belong to different P genotypes. We evaluated the entry pathway of simian rotavirus strain SA11-4S (P[2]), which binds to cells through SA. We also evaluated the cell entry of the NA-resistant human rotavirus strains Wa (P[8]), WI-61 (P[8]), and DS-1 (P[4]). These strains were recently reported to bind Lewis b and H type 1 histo-blood group antigens, suggesting that they may use these molecules as receptors for cell attachment (27). Additionally, we evaluated the infectivity of the NA-sensitive porcine rotavirus strain YM (P[7]). The infectivities of all these strains were determined in MA104 cells treated with a hypertonic medium or with the siRNA against CHC. Of note, under both conditions and despite the occurrence of binding to the terminal SA on the cell surface, the infectivities of the SA11-4S and YM virus strains were decreased (Fig. 5). Similarly, the infectivities of the human rotavirus strains Wa, WI-61, and DS-1 decreased significantly in cells treated with sucrose and were inhibited between 50% and 75% in cells transfected with the siRNA against CHC compared to cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents the 100% infectivity in each case. These findings suggest that different VP4-cell surface interactions can lead to rotavirus cell entry by a clathrin-dependent endocytic process.

DISCUSSION

Rotavirus entry into MA104 cells occurs through endocytosis with the use of different mechanisms depending on the virus strain (19). Taking advantage of the differential endocytic pathways used by the rotavirus UK and RRV strains to enter MA104 cells, we used a panel of UK × RRV reassortants to determine the viral protein that segregates with the type of endocytosis employed. Analysis of these reassortants showed unambiguously that the spike protein VP4 defines the clathrin-mediated endocytosis entry of UK since the reassortant virus 19, which has a UK VP4 protein in a capsid otherwise formed by RRV proteins, is also clathrin dependent. Even though our collection did not have a single reassortant virus with an RRV VP4 on a UK capsid protein background, the presence of UK VP7 (reassortant 85) and VP6 (reassortants 13, 25, and 27) in viruses that enter cells by a clathrin-independent process, as RRV does, strongly suggests that RRV VP4 also determines the endocytic pathway used by RRV. Although unlikely, the possibility that RRV VP2, present in all viruses with an RRV-like mechanism of entry, might influence the conformation of VP4 and help define the entry route of these reassortant viruses cannot be discounted. Also, the lack of correlation between the G genotype and the mode of entry of the various rotavirus strains characterized in this work suggests that VP7 is not involved in determining the endocytic pathway of rotaviruses other than RRV and UK and that VP4 is most probably the key protein in this process. However, this supposition remains to be directly tested. RRV was the only strain evaluated with a P[3] genotype; thus, it is not possible to determine if entry into the virus by a clathrin-independent route is a particular property of RRV or if it is associated with the P genotype of the virus.

It has been proposed that rotaviruses infect cells by a complex multistep process (10). Several lines of evidence suggest that rotavirus RRV interacts sequentially with several cell surface molecules during its entry into MA104 cells and uses different domains on the virus surface proteins VP4 and VP7 during this process (42). It is thought that the initial contact of RRV with the cell surface is through an SA-containing cell receptor using the VP8 domain of VP4. Gangliosides have been suggested to play this role (43, 44), although recent data suggest that gangliosides could function during rotavirus entry at a postattachment step (45). The initial interaction of VP8 with SA is proposed to induce a subtle conformational change on VP4 that allows the virus to interact subsequently with integrin $\alpha 2\beta 1$ through the DGE motif on VP5 (42). It has been proposed that after this second interaction, VP5 interacts with hsc70 and VP7 interacts with integrins $\alpha \nu \beta 3$ and $\alpha \nu \beta 2$ (11, 12, 15–18, 39). Whether these three latter interactions occur sequentially or alternatively has not been established. In this context, the single amino acid change in the RRV variant Nar3 that confers its NA resistance to infect cells was shown to allow the virus to take a shortcut, bypassing the initial interaction with SA and attaching to the cell surface directly by interacting with integrin $\alpha 2\beta 1$ through VP5 (15, 16). After their interaction with integrin $\alpha 2\beta 1$, both RRV and Nar3 viruses were thought to follow the same entry pathway. However, although subsequent to their interaction with $\alpha 2\beta 1$ both viruses interact with integrins $\alpha \nu \beta 3$ and $\alpha \nu \beta 2$ and with hsc70 (12, 39), the fact that these viruses enter cells by different endocytic routes indicates that the entry processes of rotaviruses might be more complex than thought. Further investigation is required to determine whether subtle differences in the interactions of RRV and Nar3 with one or more of the aforementioned receptors are

responsible for the different endocytic pathways taken by these viruses or whether an additional unidentified cell surface molecule is responsible for their differential cell entry phenotype.

The example of variant Nar3 is not unprecedented, since single or a few amino acid changes in echovirus (46), enterovirus (47–49), coxsackievirus (50–52), and foot-and-mouth disease virus (53–55) have been shown to be sufficient to alter the receptor specificity and the endocytic mode of entry of these viruses. In the case of rotaviruses, however, it seems that the cell surface molecule used to attach to cells does not by itself determine the type of endocytosis pathway employed for virus cell entry. As mentioned before, rotavirus strains RRV, SA11-4S, and YM are all NA sensitive, and yet they enter cells by different endocytic mechanisms. In this regard, it is of interest that the entire $\alpha 3$ - $\alpha 4$ region of integrin $\alpha 2\beta 1$ has been shown to be important for the interaction with human and RRV rotavirus strains, while this region of $\alpha 2\beta 1$ is less important for the interaction with SA11 and Nebraska calf diarrhea virus (NCDV) rotaviruses (13). These data suggest that one possible explanation for the difference in the endocytic pathway used by rotaviruses SA11 and YM, as well as by TFR-41 and that used by RRV, regardless of their sialic acid usage, could be a subtle differential interaction with one of the described receptors or a differential interaction with one additional so-far-unidentified cell surface molecule. In addition, with the exception of RRV, all other rotavirus strains tested (see also reference 19) use clathrin-mediated endocytosis to enter cells, regardless of the P genotype of the virus, the cell attachment receptor used, and whether virus infection is dependent or independent of integrins. These findings suggest that diverse VP4-cell surface interactions can lead to rotavirus cell entry via clathrin-dependent endocytosis.

In summary, in this work we have shown that the spike protein VP4 determines the pathway of cell internalization of the virus. It remains to be determined which one of the several interactions described for this protein, or whether a new VP4-cell interaction not described yet, triggers the specific endocytic process.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants IN210807 from DGAPA-UNAM and 153639 and 102823 from CONACyT.

We thank E. López and P. Gaytán for oligonucleotide synthesis and J. Yáñez for DNA sequencing. M.A.D.-S. is a recipient of a scholarship from CONACyT.

REFERENCES

- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12:304–306.
- Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses, p 1918–1974. In Knipe DMH, Peter M. (ed), *Fields virology*, 5th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70:5832–5839.
- Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39:816–822.
- Espejo RT, López S, Arias C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156–160.
- Estes MK, Graham DY, Mason BB. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39:879–888.
- López S, Arias CF, Bell JR, Strauss JH, Espejo RT. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11–19.
- Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430:1053–1058.

9. Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 21:885–897.
10. López S, Arias CF. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12:271–278.
11. Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, Robinson MK, Coulson BS. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77:9969–9978.
12. Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias CF. 2000. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14644–14649.
13. Fleming FE, Graham KL, Takada Y, Coulson BS. 2011. Determinants of the specificity of rotavirus interactions with the alpha2beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* 286:6165–6174.
14. Graham KL, Takada Y, Coulson BS. 2006. Rotavirus spike protein VP5* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J. Gen. Virol.* 87:1275–1283.
15. Zárate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, López S. 2000. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278:50–54.
16. Zárate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, López S. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* 74:593–599.
17. Guerrero CA, Bouyssonade D, Zárate S, Isa P, López T, Espinosa R, Romero P, Méndez E, López S, Arias CF. 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76:4096–4102.
18. Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, López S. 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* 77:7254–7260.
19. Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, López S. 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 84:9161–9169.
20. Fuentes-Panana EM, López S, Gorziglia M, Arias CF. 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J. Virol.* 69:2629–2632.
21. Isa P, Arias CF, López S. 2006. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23:27–37.
22. Ciarlet M, Estes MK. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80:943–948.
23. Ciarlet M, Ludert JE, Iturriza-Gomara M, Liprandi F, Gray JJ, Desselberger U, Estes MK. 2002. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J. Virol.* 76:4087–4095.
24. Delorme C, Brussov H, Sidoti J, Roche N, Karlsson KA, Neeser JR, Teneberg S. 2001. Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol.* 75:2276–2287.
25. Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, Santegoets K, Kiefel MJ, Blanchard H, Coulson BS, von Itzstein M. 2009. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat. Chem. Biol.* 5:91–93.
26. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV. 2012. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485:256–259.
27. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, Morrow A, Jiang X. 2012. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* 86:4833–4843.
28. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, Castello AA, Jiang B, Jiang X. 2012. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range and interaction with HBGAs. *J. Virol.* 86:9899–9910.
29. López JA, Maldonado AJ, Gerder M, Abanero J, Murgich J, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. 2005. Characterization of neuraminidase-resistant mutants derived from rotavirus porcine strain OSU. *J. Virol.* 79:10369–10375.
30. Ludert JE, Mason BB, Angel J, Tang B, Hoshino Y, Feng N, Vo PT, Mackow EM, Ruggeri FM, Greenberg HB. 1998. Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J. Gen. Virol.* 79:725–729.
31. Méndez E, Arias CF, López S. 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* 70:1218–1222.
32. Sánchez-San Martín C, López T, Arias CF, López S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78:2310–2318.
33. Wolf M, Deal EM, Greenberg HB. 2012. Rhesus rotavirus trafficking during entry into MA104 cells is restricted to the early endosome compartment. *J. Virol.* 86:4009–4013.
34. Wolf M, Vo PT, Greenberg HB. 2011. Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *J. Virol.* 85:2492–2503.
35. Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, Deal EM, Greenberg HB. 2009. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J. Virol.* 83:6987–6994.
36. Méndez E, Arias CF, López S. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67:5253–5259.
37. Ruiz AM, López IV, López S, Espejo RT, Arias CF. 1988. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J. Virol.* 62:4331–4336.
38. Pando V, Isa P, Arias CF, López S. 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295:190–200.
39. Zárate S, Romero P, Espinosa R, Arias CF, López S. 2004. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site. *J. Virol.* 78:10839–10847.
40. Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. 1993. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* 121:61–72.
41. Heuser JE, Anderson RG. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108:389–400.
42. López S, Arias CF. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309:39–66.
43. Colarow L, Turini M, Teneberg S, Berger A. 2003. Characterization and biological activity of gangliosides in buffalo milk. *Biochim. Biophys. Acta* 1631:94–106.
44. Yu X, Coulson BS, Fleming FE, Dyason JC, von Itzstein M, Blanchard H. 2011. Novel structural insights into rotavirus recognition of ganglioside glycan receptors. *J. Mol. Biol.* 413:929–939.
45. Martínez MA, López S, Arias CF, Isa P. 7 November 2012. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.01964-12.
46. Lévêque N, Norder H, Zreik Y, Cartet G, Falcon D, Rivat N, Chomel JJ, Hong SS, Lina B. 2007. Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway. *Virus Res.* 130:1–9.
47. Sobo K, Rubbia-Brandt L, Brown TD, Stuart AD, McKee TA. 2011. Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells. *J. Virol.* 85:12376–12386.
48. Stuart AD, Eustace HE, McKee TA, Brown TD. 2002. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J. Virol.* 76:9307–9322.
49. Stuart AD, McKee TA, Williams PA, Harley C, Shen S, Stuart DI, Brown TD, Lea SM. 2002. Determination of the structure of a decay accelerating factor-binding clinical isolate of echovirus 11 allows mapping of mutants with altered receptor requirements for infection. *J. Virol.* 76:7694–7704.
50. Chung SK, Kim JY, Kim IB, Park SI, Paek KH, Nam JH. 2005. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* 333:31–40.
51. Pan J, Narayanan B, Shah S, Yoder JD, Cifuentes JO, Hafenstein S, Bergelson JM. 2011. Single amino acid changes in the virus capsid permit coxsackievirus B3 to bind decay-accelerating factor. *J. Virol.* 85:7436–7443.
52. Patel KP, Coyne CB, Bergelson JM. 2009. Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells. *J. Virol.* 83:11064–11077.
53. Berryman S, Clark S, Monaghan P, Jackson T. 2005. Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 79:8519–8534.
54. O'Donnell V, Larocco M, Baxt B. 2008. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J. Virol.* 82:9075–9085.
55. O'Donnell V, LaRocco M, Duque H, Baxt B. 2005. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J. Virol.* 79:8506–8518.

XVIII. ANEXO 2

Artículo publicado en “Journal of Virology”:

“Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell”.

Rotaviruses Reach Late Endosomes and Require the Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor and the Activity of Cathepsin Proteases To Enter the Cell

Marco A. Díaz-Salinas, Daniela Silva-Ayala, Susana López and Carlos F. Arias

J. Virol. 2014, 88(8):4389. DOI: 10.1128/JVI.03457-13.

Published Ahead of Print 5 February 2014.

Updated information and services can be found at:
<http://jvi.asm.org/content/88/8/4389>

These include:

REFERENCES

This article cites 76 articles, 42 of which can be accessed free at: <http://jvi.asm.org/content/88/8/4389#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Rotaviruses Reach Late Endosomes and Require the Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor and the Activity of Cathepsin Proteases To Enter the Cell

Marco A. Díaz-Salinas, Daniela Silva-Ayala, Susana López, Carlos F. Arias

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ABSTRACT

Rotaviruses (RVs) enter cells through different endocytic pathways. Bovine rotavirus (BRV) UK uses clathrin-mediated endocytosis, while rhesus rotavirus (RRV) employs an endocytic process independent of clathrin and caveolin. Given the differences in the cell internalization pathway used by these viruses, we tested if the intracellular trafficking of BRV UK was the same as that of RRV, which is known to reach maturing endosomes (MEs) to infect the cell. We found that BRV UK also reaches MEs, since its infectivity depends on the function of Rab5, the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT), and the formation of endosomal intraluminal vesicles (ILVs). However, unlike RRV, the infectivity of BRV UK was inhibited by knocking down the expression of Rab7, indicating that it has to traffic to late endosomes (LEs) to infect the cell. The requirement for Rab7 was also shared by other RV strains of human and porcine origin. Of interest, most RV strains that reach LEs were also found to depend on the activities of Rab9, the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD-M6PR), and cathepsins B, L, and S, suggesting that cellular factors from the *trans*-Golgi network (TGN) need to be transported by the CD-M6PR to LEs to facilitate RV cell infection. Furthermore, using a collection of UK × RRV reassortant viruses, we found that the dependence of BRV UK on Rab7, Rab9, and CD-M6PR is associated with the spike protein VP4. These findings illustrate the elaborate pathway of RV entry and reveal a new process (Rab9/CD-M6PR/cathepsins) that could be targeted for drug intervention.

IMPORTANCE

Rotavirus is an important etiological agent of severe gastroenteritis in children. In most instances, viruses enter cells through an endocytic pathway that delivers the viral particle to vesicular organelles known as early endosomes (EEs). Some viruses reach the cytoplasm from EEs, where they start to replicate their genome. However, other viruses go deeper into the cell, trafficking from EEs to late endosomes (LEs) to disassemble and reach the cytoplasm. In this work, we show that most RV strains have to traffic to LEs, and the transport of endolysosomal proteases from the Golgi complex to LEs, mediated by the mannose-6-phosphate receptor, is necessary for the virus to exit the vesicular compartment and efficiently start viral replication. We also show that this deep journey into the cell is associated with the virus spike protein VP4. These findings illustrate the elaborate pathway of RV entry that could be used for drug intervention.

Rotaviruses (RVs) are nonenveloped viruses, members of the family *Reoviridae*, and the leading etiological agents of viral gastroenteritis in infants and young children worldwide (1). These viruses are composed of a triple-layered protein capsid that surrounds the viral genome. The outermost layer is composed of two proteins: VP7, which forms the smooth surface of the virus, and the spike protein VP4, which functions as the virus attachment protein (2). VP4 is cleaved by trypsin into two subunits, VP8 and VP5, and this cleavage is required for the virus to enter the cell (3–7). It has been proposed that during the entry process VP4 undergoes structural changes that lead to conversion of the mature infectious RV triple-layered particles (TLPs) into transcriptionally active double-layered particles (DLPs) that start transcribing the viral genome once they reach the cytosolic compartment (8–11). Nonetheless, a direct functional correlation of the proposed structural changes in VP4 with cellular factors that might trigger these changes has not been shown.

The initial step in a viral infection is the attachment of the virus to specific receptors on the cell surface, an interaction that frequently triggers cellular signaling cascades that facilitate either virus entry or replication (12). In most instances, virus internalization proceeds through an endocytic pathway that delivers the

viral particle to early endosomes (EEs), characterized by the presence of the GTPase Rab5 and the early endosomal antigen 1 (EEA1) (13–15). Some viruses then traffic from these EE compartments to late endosomes (LEs), which are enriched in the GTPase Rab7 (16, 17). Of the various small GTPases present in endosomes, Rab5 and Rab7 are the most critical for the function of EEs and LEs, respectively (18). Rab5 is involved in the regulation of the fusion of endocytic primary vesicles with EEs and also in homofusions between EEs (19–21), while Rab7 participates in LE formation and cargo transport to lysosomes (22). The switch from Rab5 to Rab7 occurs via formation of hybrid endosomes that carry both Rab GTPases in separate domains (23). These endosomes,

Received 1 December 2013 Accepted 27 January 2014

Published ahead of print 5 February 2014

Editor: R. M. Sandri-Goldin

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

M.A.D.-S. and D.S.-A. contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.03457-13

which are also known as maturing endosomes (MEs) (24), are also characterized by the presence of intraluminal vesicles (ILVs) that are formed by the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery (25). The maturation process of late endosomes also involves a drop in the luminal pH and calcium concentration, acquisition of lysosomal components, and formation of additional ILVs (26). Newly synthesized lysosomal acid hydrolases are delivered from the *trans*-Golgi network (TGN) to endosomes by mannose-6-phosphate receptors (M6PRs), and recycling of M6PRs back to TGN depends on the small GTPase Rab9 (27). Among the hydrolases transported to endosome/lysosome bodies from the TGN are cysteine cathepsins, proteases that for a long time were mainly considered protein-degrading enzymes within lysosomes and are currently considered signaling molecules in a variety of biological processes that take place in the extracellular space as well as in the cytosol and nucleus (28). During their vesicular traffic, viruses are exposed to modifications in the endosomal environment (low pH, low calcium concentration, proteolytic activity, etc.) that trigger conformational changes in the viral particle that promote the delivery of the viral genome into the cytoplasm (29). Viruses that escape the endocytic compartments from EEs have been defined as early-penetrating (E-P) viruses, while those that reach LEs have been defined as late-penetrating (L-P) viruses (17).

Several molecules have been identified as cellular receptors and/or coreceptors for RVs, including, sialic acid, integrins, and HSC70 (30), and more recently, the VP4 protein of some virus strains was found to attach to human histo-blood group antigens (31–35). After the initial interactions of the virus with cell surface molecules, different RV strains enter the cells through distinct endocytic pathways that are determined by the spike protein VP4 (36, 37). Rhesus rotavirus (RRV), one of the most characterized RV strains, enters cells by exploiting a clathrin- and caveolin-independent endocytic pathway (38), and then it traffics through EEs to reach MEs (39, 40), where the virion presumably uncoats to yield DLPs that escape the endosomal compartment to enter the cytoplasm. In contrast to RRV, several other RV strains, including bovine rotavirus (BRV) UK, are internalized into the cell through a clathrin-dependent mechanism (36, 37).

Given the different endocytic pathways employed by rotavirus strains RRV and UK to infect the cell, in this work we determined whether the intracellular traffic used by BRV UK is the same as that used by RRV and whether the transit of BRV UK is also defined by the spike protein VP4. The characterization of these two strains, as well as a collection of UK × RRV reassortant viruses, allowed us to show that BRV UK and RRV differ not only in the endocytic mechanism employed for cell internalization but also in the intracellular traffic of the incoming virus particle. Both RV strains require the formation of ILVs. However, while RRV only needs to reach MEs for cell infection and as such can be considered an E-P virus, BRV UK reaches the LE compartment, behaving as an L-P virus. The differential traffic of these viruses was found to be associated with the spike protein VP4. Importantly, we also found that, in contrast to RRV, the cell entry of BRV UK as well as that of other RV strains of human and porcine origin depends on the GTPase Rab9, the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD-M6PR), and the activities of cysteine cathepsins B, L, and S.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 and the murine fibroblast L929 cell line (ATCC) were grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM; Invitrogen) supplemented with 5% and 10% fetal bovine serum (FBS), respectively, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The RRV strain (G3P[3]), BRV UK strain (G6P[5]), and UK × RRV reassortants used in this work were kindly donated by Y. Hoshino (NIAID, NIH, Bethesda, MD) and have been previously described (37, 41). RRV variant Nar3 and its revertants, clones 14 and 18 (revertant Nar3-14 [rNar3-14] and revertant Nar3-18 [rNar3-18]), have been described previously (42, 43). Human RV strains Wa (G1P[8]) and DS-1 (G2P[4]) were obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), and RV WI-61 (G9P[8]) was obtained from F. H. Clark (Wistar Institute, Philadelphia, PA) through M. K. Estes. Simian RV SA11-4S (clone 3; G3P[2]) was obtained from M. K. Estes (Baylor College of Medicine, Houston, TX), and porcine strain YM (G11P[7]) was isolated in our laboratory (44). All RV strains were propagated in MA104 cells as previously described (45). RV cell lysates were activated with trypsin (10 µg/ml) for 30 min at 37°C. TLPs and DLPs of the RRV and BRV UK strains were purified by CsCl isopycnic gradients as described previously (45). The mammalian reovirus strain type 3 Dearing (ReoT3D) was a kind donation of T. S. Dermody (Vanderbilt University, Nashville, TN). ReoT3D was propagated in L929 cells, and the viral titer was determined in MA104 cells as previously described (36, 46).

Antibodies, reagents, and plasmids. Monoclonal antibodies were used for detection of cellular proteins. Rab5a, EEA1, and Rab7a antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, MA), while Rab9a antibody was from GeneTex, Inc. (Irvine, CA). 4',6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) and Alexa 488- and 568-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Grand Island, NY). Mouse monoclonal antibody against lysobisphosphatidic acid (LBPA) was purchased from Echelon Biosciences Inc. (Salt Lake City, UT). Rabbit hyperimmune sera to purified RV particles (anti-TLPs), RV nonstructural protein 5 (anti-NSP5), and purified reovirus particles (anti-Reo) were produced in our laboratory. Horseradish peroxidase-conjugated goat antirabbit polyclonal antibody was from PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA). Paraformaldehyde (PFA), bovine serum albumin (BSA), Triton X-100, and cathepsin B inhibitor (CA-074) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Ammonium chloride was from J. T. Baker (Center Valley, PA). Cathepsin L inhibitor (Z-FF-FMK) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Leupeptin was obtained from Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN). Plasmids expressing Rab5Q79L, Rab5S534N, Rab7, and Rab7NI25I were kindly provided by J. Gruenberg (University of Geneva, Geneva, Switzerland), and their use has been previously described (47, 48). The plasmids encoding Cdc42 (cell division control protein 42 homolog), Cdc42N17, and Cdc42V12 proteins fused to green fluorescent protein (GFP) were a gift from F. Sanchez-Madrid (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain) (49). Plasmids expressing cyan fluorescent protein (CFP)-labeled hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS), yellow fluorescent protein (YFP)-labeled tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and its dominant negative (DN) variant GFP-TSG101/1-157, as well as plasmids expressing CFP-labeled vacuolar protein sorting 4 homolog A (VPS4A) and the DN CFP-VPS4A-E228Q were kindly provided by P. D. Bieniasz (Rockefeller University, New York, NY), and their use has been previously described (50). The small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from Dharmacon-Thermo Scientific (Pittsburg, PA).

Transfection of plasmids and siRNAs. The indicated plasmids were transfected into MA104 cells as previously described (38, 40). The plasmid transfection efficiency was about 50%. At 8 h posttransfection (hpt), the transfection mixture was removed and fresh advanced Dulbecco modified Eagle medium–5% FBS was added. At 24 to 48 hpt, the cells were infected with the indicated RV strains. The indicated siRNAs were transfected into MA104 cells by a reverse method, as described previously (36). As a con-

control condition, an irrelevant siRNA against glucose-regulated protein 94 (GRP94) or luciferase (Luc) was used. At 72 hpi, the cells were washed twice with MEM and subsequently infected with the indicated RV strain. None of the assayed siRNAs was cytotoxic at the concentrations used, as determined by a lactate dehydrogenase (LDH) release assay, using a commercial kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO).

Infectivity assays. Virus infectivity was determined by either immunoperoxidase or immunofluorescence focus-forming assays. For the immunoperoxidase assay, MA104 cells were washed twice with MEM and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.02 with cell lysates of the indicated RV strains or a cell lysate of reovirus T3D. After 1 h of adsorption, the virus was removed, and the cells were washed twice and incubated with MEM for 14 h in the case of RV assays and for 16 h in reovirus assays. Cell monolayers were subsequently fixed, and infected cells were detected as described previously (36). The detection of viral antigen was optimal at these times postinfection with the immunocytochemical staining used. Infection of MA104 cells with lipofected RV DLPs was carried out as previously described (36). For the immunofluorescence assay, MA104 cells grown on glass coverslips were transfected for transient-expression assays or with siRNAs as described above and infected with the indicated virus at an MOI of 3. After 1 h of adsorption, the inoculum was removed and the cells were washed twice with MEM. Since the immunofluorescence assay is more sensitive for detection of viral antigen than the immunoperoxidase assay, the cells were fixed at 6 h postinfection (hpi) and prepared for immunofluorescence. Infected cells were detected by incubation for 1 h at room temperature using a rabbit hyperimmune serum to NSP5 as the primary antibody, followed by incubation with the corresponding Alexa-labeled secondary antibody for 1 h at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Fluoromount (Exelisis Diagnostics, Athens, Greece). The slides were analyzed with a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 2 mot plus) coupled to a digital camera (Photometrics Cool Snap HQ) as previously described (40). In the case of transient-expression assays, the infectivity of the indicated RV was determined by considering only the infected cells that expressed either the wild-type protein or the mutant version of interest. Both immunoperoxidase and immunofluorescent assays gave essentially the same results when the infectivity of the viruses was determined. When DLPs were lipofected into cells, they were used at a concentration that would yield about 80% of infected cells in the immunofluorescence assay and to infect cells at an MOI equivalent to 0.02 in the immunoperoxidase assay.

Binding assays. MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs as described above. Confluent cells were then washed twice and incubated with MEM for 30 min at 37°C, and virus binding was assayed as previously described (51). To evaluate virus binding in cells treated with neuraminidase (NA), the assay was carried out as previously described (37).

Cell treatments. For LBPA-blocking assays, MA104 cells were preincubated with 50 µg/ml of anti-LBPA antibody or with 50 µg/ml of an isotype IgG control for 16 h and infected with the indicated RV strains for 1 h at 4°C in the absence of antibody. Cells were washed twice, incubated at 37°C in MEM for 6 h, and processed for immunofluorescence assay as previously described (40). For the assays with protease inhibitors, MA104 cells were pretreated with 25 µM leupeptin (in water) or with 5 µM cathepsin B or L inhibitors (in DMSO) for 1 h at 37°C. As controls, the cells were mock treated for assays with leupeptin and cathepsin inhibitors. The indicated virus (used to infect cells at an MOI of 0.02) was then adsorbed for 1 h at 37°C in the presence of the inhibitor. The virus inoculum was then removed and cells were washed with MEM. At 14 or 16 hpi (for RV or reovirus infection, respectively), the cell monolayers were fixed and the infected cells were detected by an immunoperoxidase assay as described above. The indicated protease inhibitors were maintained during the entire infection assay. None of the cell treatments with protease inhibitors at the concentrations used was cytotoxic, as determined by the LDH release assay described above.

Colocalization of rotavirus particles with endocytic markers. MA104 cells grown on glass coverslips were washed twice with MEM. CsCl-purified BRV UK TLPs or an Nar3 lysate (MOI = 50) was added, and the mixture was incubated for 1 h at 4°C; unbound virus was removed by washing, and the cells were incubated in MEM at 37°C for the indicated periods of time. The cells were then fixed, processed for immunofluorescence assay, and analyzed by fluorescence confocal microscopy as previously described (40). Primary antibodies (monoclonal antibodies to EEA1, Rab7, or Rab9 or anti-TLP antibodies) and secondary antibodies were incubated as previously described (40). The expressed ESCRT protein HRS was fused to CFP for its detection. Colocalization of cellular proteins and viral particles was visualized using a Bio-Rad MRC confocal microscope coupled to an AxioPhot camera (Zeiss) or a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope. Each colocalization assay was performed in duplicate cover glasses, and five randomly selected cells per cover glass and per time point were analyzed with ImageJ (version 1.45S) software using a colocalization plug-in, and quantification of the signal was made with a threshold of 0.03 to 1.3 µm² (40).

Immunoblot analysis. Cells were lysed in Laemmli sample buffer and denatured by boiling for 5 min. The cell lysate samples were then subjected to SDS-PAGE and transferred to Immobilon NC membranes (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) or phosphate-buffered saline containing 5% nonfat dry milk before they were incubated with the indicated antibodies. The bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody and a Western Lightning system (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA).

qRT-PCR. The efficiency with which siRNAs knocked down the expression of some genes was determined by quantifying the mRNAs encoding the target protein by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) as previously described (40). To determine the internalization of viral particles, the genomic RNA negative strand was amplified using forward primers for the VP6 RV gene as described previously (52). The sequences of the forward and reverse primers used to evaluate the CD-M6PR mRNA were 5'-CTGGTAGCAGATGGCTGTGA-3' and 5'-ACTGAGGAAGAGGCTGGACA-3', respectively.

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated by using a two-tailed paired *t* test with GraphPad Prism (version 5.0) software (GraphPad Software, Inc.). *P* values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Rotavirus strains UK and RRV reach different endocytic compartments during cell infection. RRV and BRV UK enter cells using different endocytic mechanisms (36, 38). It is not known, however, if both viruses follow the same vesicular traffic upon cell entry. RRV has been shown to exit the endocytic compartment after reaching a mature form of EEs (40), while BRV UK was shown to colocalize with Rab5a, a marker of EEs, suggesting that this virus might also reach the EE compartment (39). To define the vesicular traffic of BRV UK, we tested the effect of siRNAs directed to various Rab GTPases involved in different steps of the vesicular traffic. For this, MA104 cells were treated with the indicated siRNAs and then were either infected with BRV UK-TLPs or lipofected with BRV UK DLPs, and the resulting virus infectivity was measured by either immunoperoxidase or immunofluorescence focus-forming assays, as indicated in Materials and Methods and the appropriate figure legends. The level of gene silencing by the siRNAs used was evaluated either by Western blotting or by qRT-PCR; all siRNAs used had a silencing efficiency of 80% or more (data not shown). All siRNAs against the three isoforms of Rab5, the early endosomal antigen (EEA1), and the GTPase Cdc42 decreased BRV UK infectivity (Fig. 1A). In contrast, in cells trans-

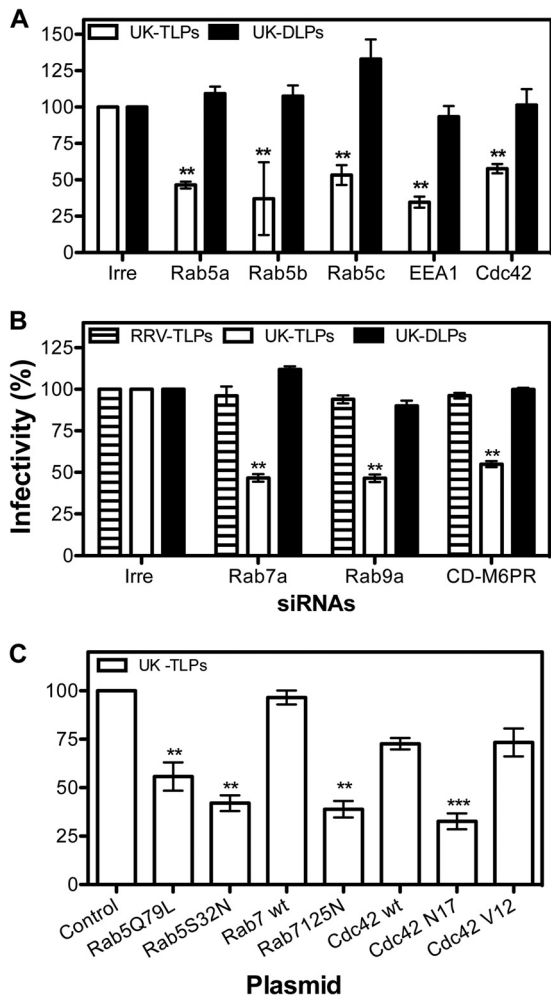


FIG 1 Evaluation of vesicular traffic components on the infectivity of BRV UK. (A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNA and then infected with BRV UK at an MOI of 3 or lipofected with BRV UK DLPs. At 6 hpi, cells were fixed and virus infectivity was determined by an immunofluorescence assay, as indicated in Materials and Methods. (B) MA104 cells transfected with the indicated siRNA were infected with RV strains RRV and UK at an MOI of 0.02 or lipofected with BRV UK DLPs. At 14 hpi, the cells were fixed and the virus was detected by an immunoperoxidase assay as described in Materials and Methods. In panels A and B, data are expressed as the percent infectivity of the virus compared to that observed in cells transfected with an irrelevant siRNA (Irre), which represents 100% infectivity. (C) MA104 cells were transfected with plasmids encoding the wild-type (wt; for Rab7a and Cdc42) or mutant versions of GTPases Rab5a (Rab5Q79L and Rab5S32N), Rab7 (Rab7125N), and Cdc42 (Cdc42N17 and Cdc42V12). At 24 hpi, the cells were infected with BRV UK and analyzed by confocal fluorescence microscopy, as described in Materials and Methods. BRV UK infectivity in cells expressing the mutant versions of the indicated GTPases was obtained by normalizing against the infectivity observed in cells expressing the respective wild-type protein version or, in the case of the Rab5a mutant, against the infectivity observed in cells transfected with the empty plasmid, which in both cases represents 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations of three independent experiments performed in duplicate are shown. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

ected with transcriptionally active BRV UK DLPs, used to bypass the virus entry step, the same siRNAs did not have a significant effect on virus replication. These results suggest that all three isoforms of Rab5, EEA1, and the GTPase Cdc42 that regulates different types of endocytosis are required for BRV UK cell entry. Thus,

as recently reported for RRV (39, 40), BRV UK also seems to reach EEs after entering the cell via clathrin-dependent endocytosis (36). However, unlike RRV, whose entry pathway was described to be restricted either to EEs (39) or to an ME compartment (40), the infectivity of BRV UK determined by immunoperoxidase focus-forming assays was found to decrease when the expression of Rab7a and Rab9a was silenced, suggesting that BRV UK needs to reach LEs to infect the cell (Fig. 1B). The infectivity of transfected BRV UK DLPs was not affected by these siRNAs, indicating again that their effect is limited to virus entry. In these assays, we also evaluated the participation of CD-M6PR in the infectivity of both RRV and UK RV strains. CD-M6PR is involved in the transport of proteins from the TGN to LEs and contributes to the maturation of this compartment (26). Interestingly, while the infectivity of RRV was not affected by the siRNA against CD-M6PR, that of BRV UK was decreased by this treatment (Fig. 1B).

The participation of Cdc42, Rab5, and Rab7 in BRV UK infectivity was confirmed by overexpressing constitutively active (CA) and dominant negative (DN) mutants of these proteins (49). The expression of Cdc42 N17, a DN variant of Cdc42 (49), decreased the infectivity of BRV UK by more than 60% percent compared to that with expression of the wild-type or CA Cdc42 V12 protein (Fig. 1C), which did not significantly affect it. Among other endocytosis-independent effects, the Cdc42 V12 mutant has been described to block macropinocytosis events by decreasing filopodia formation; thus, as expected, it did not decrease BRV UK infectivity, which depends on clathrin-mediated endocytosis. Rab5Q79L, the CA mutant of Rab5, stimulates the rate of endocytosis and homotypic fusion of EEs but blocks their conversion to late endosomes, whereas the DN Rab5S32N variant prevents vesicle fusion (47); expression of either mutant generated a clear decrease in BRV UK infectivity (Fig. 1C). Furthermore, in agreement with the RNA interference (RNAi) assays, the expression of the DN mutant of Rab7, Rab7N125I, defective in guanine nucleotide binding (48), decreased by more than 60% the infectivity of BRV UK compared with that of its wild-type counterpart, confirming that the function of this protein is necessary for the cell entry of BRV UK. Altogether, the previous data suggest that while RRV requires only EE formation, the cell entry of BRV UK requires trafficking from EEs to LEs. In turn, the inhibition of BRV UK infectivity by Rab9a suggests that the transit of CD-M6PR cargo from the TGN to endosomes is needed for cell entry of this RV strain.

BRV UK dependence on Rab7/Rab9 is associated with the VP4 capsid protein. As shown above, BRV UK requires the activity of the small GTPases Rab7 and Rab9 for its infectivity, while RRV does not. To investigate the RV protein(s) associated with the differential vesicular traffic of RRV and BRV UK, the infectivity of reassortant UK \times RRV viruses (Table 1) was evaluated in cells treated with either small interfering RNA against Rab7a (siRab7a) or siRab9a (Fig. 2A and B). Of interest, the infectivity of reassortants 9, 19, and 20, which contained the VP4 protein from BRV UK origin, decreased significantly in both Rab7a- and Rab9a-silenced cells, while the infectivity of reassortants 25 and 85, which had the VP4 protein derived from RRV, remained unaffected. These results strongly suggest a correlation between the viral origin of the VP4 protein and the virus dependence on Rab7a/Rab9a to infect cells. This observation is reinforced by the fact that reassortant 19, whose infectivity was sensitive to Rab7a/Rab9a silencing, is a single-gene reassortant virus that contains the BRV UK VP4 gene in an otherwise RRV genetic background,

TABLE 1 Capsid proteins of UK × RRV reassortants employed in this study

| Virus ^b | Origin of virus capsid proteins ^a : | | | | | |
|-----------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| | VP1 | VP3 | VP2 | VP6 | VP7 | VP4 |
| UK | U | U | U | U | U | U |
| RRV | R | R | R | R | R | R |
| UK × RRV reassortants | | | | | | |
| 9 (9-8-1) | U | U | U | U | R | U |
| 19 (19-1-1) | R | R | R | R | R | U |
| 20 (20-1-1) | U | U | R | R | U | U |
| 21 (21-1-1) | U | U | U | R | U | U |
| 25 (25-2-1) | R | R | R | U | R | R |
| 85 (85-2) | U | R | R | R | U | R |

^a U, the protein is of BRV UK origin; R, the protein is of RRV origin.

^b Numbers in parentheses are the original reported names of the reassortant viruses (37, 41).

while reassortant 85, which had the BRV UK VP1 and VP7 genes in an RRV genetic background (including VP4), behaved like the parental strain RRV. A mono-reassortant containing the VP4 of RRV on the BRV UK genetic background was not available for testing.

The CD-M6PR dependence of BRV UK infectivity correlates with the presence of the spike protein VP4. Following the same strategy described above for Rab7a and Rab9a, we found that VP4 is also associated with the CD-M6PR-dependent infectivity of BRV strain UK, since those UK × RRV reassortant viruses bearing the VP4 protein of BRV UK were also dependent on the activity of this receptor (Fig. 3A). Since CD-M6PR has also been reported to be present in the cell plasma membrane (reviewed in reference 53), it was possible that silencing of its expression could prevent the attachment of BRV UK to the cell surface. To exclude this possibility, we carried out virus binding assays in CD-M6PR-knockdown cells (Fig. 3B). The binding of RRV to cells treated with an siRNA against CD-M6PR (siCD-M6PR) was not significantly affected compared to that in control cells transfected with an irrelevant siRNA, while it was severely decreased when the CD-M6PR-knockdown cells were treated with neuraminidase (NA), which removes the sialic acid required for cell attachment of RRV (54). In contrast, the binding of the UK virus was not affected in CD-M6PR-knockdown cells treated or not with NA (Fig. 3B), as expected, since BRV UK infection is insensitive to NA treatment (55), suggesting that CD-M6PR is not relevant for the cell attachment of either BRV UK or RRV. Furthermore, the possibility that interfering with the function of CD-M6PR could prevent the transport or recycling of a BRV UK receptor to the plasma membrane was ruled out by showing that BRV UK internalization, as measured by qRT-PCR of the incoming RNA genomic negative strand, was not reduced under these conditions compared to that in control cells transfected with an irrelevant siRNA (Fig. 3C), suggesting that knocking down the expression of CD-M6PR does not affect the cell internalization process of this virus. The level of the negative strand observed at 0 min was higher than that observed at 60 min, since under the former condition the genomes of all viruses adsorbed to the cell surface were detected, while at 60 min, the adsorbed virus that had not been internalized was removed by washing with EGTA (see Materials and Methods and the legend to Fig. 3). All these data strongly suggest that the de-

pendence of BRV UK on CD-M6PR is associated with the virus spike protein VP4 and that the virus requires CD-M6PR during cell entry after the internalization step.

A single amino acid change in VP4 is associated with the late penetration phenotype of rotavirus. We previously reported that a single amino acid change (Lys to Arg at amino acid 187) in the VP4 protein of Nar3, an NA-resistant mutant of RRV, is responsible for the neuraminidase resistance phenotype, since reversion of arginine 187 to lysine again conferred to the revertant Nar3 virus its neuraminidase sensitivity to virus infection (43). This amino acid change was also found to be associated with the endocytic pathway, followed by RRV infection of cells. Nar3 as well as UK viruses enter cells by clathrin-mediated endocytosis, while RRV and Nar3 revertant viruses use a poorly defined endocytic pathway that is clathrin and caveolin independent (37). Since the late penetration phenotype of BRV UK seems to be associated with its VP4 protein, we tested whether the Nar3 mutant also behaved as a late-penetrating (L-P) virus. For this, the roles of GTPases Rab7a and Rab9a and of CD-M6PR on the infectivity of Nar3 were evaluated. We found that the infectivity of Nar3 decreased by 50 to 60% when the cells were previously transfected with siRNA to Rab7a or Rab9a, while the infectivity of revertant viruses rNar3-14 and rNar3-18, as well as that of wt RRV, remained unaffected by this treatment (Fig. 4A). Overexpression of DN and CA mutants of Rab5a and Rab7a confirmed the functional importance of these GTPases on the entry process of the NA-resistant RRV variant Nar3 (Fig. 4B). In contrast, it was surprising to find that the infectivity of Nar3 was not affected by knocking down the expression of CD-M6PR, and as such, it behaved differently from BRV UK

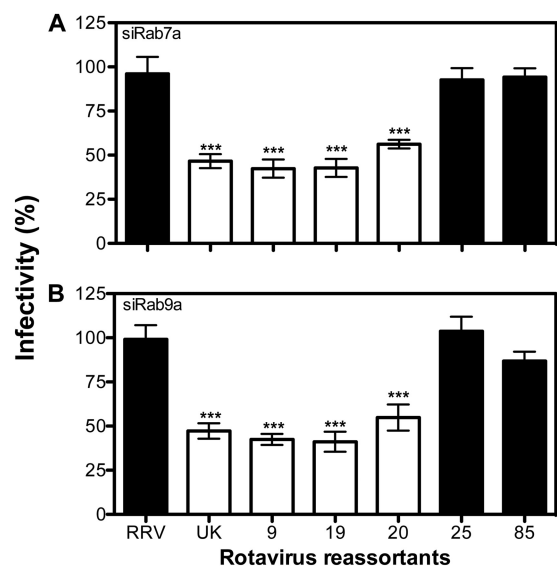


FIG 2 Effect of Rab7a and Rab9a silencing on the infectivity of UK × RRV reassortant viruses. MA104 cells transfected with siRNA against either Rab7a (A) or Rab9a (B) were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hpi, the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the level of infectivity of cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% infectivity. Black bars, RRV and reassortants bearing RRV VP4; white bars, BRV UK and reassortants bearing BRV UK VP4 (see Table 1 for reassortant compositions). The arithmetic means ± standard deviations of three independent experiments performed in duplicate are shown. ***, $P < 0.001$.

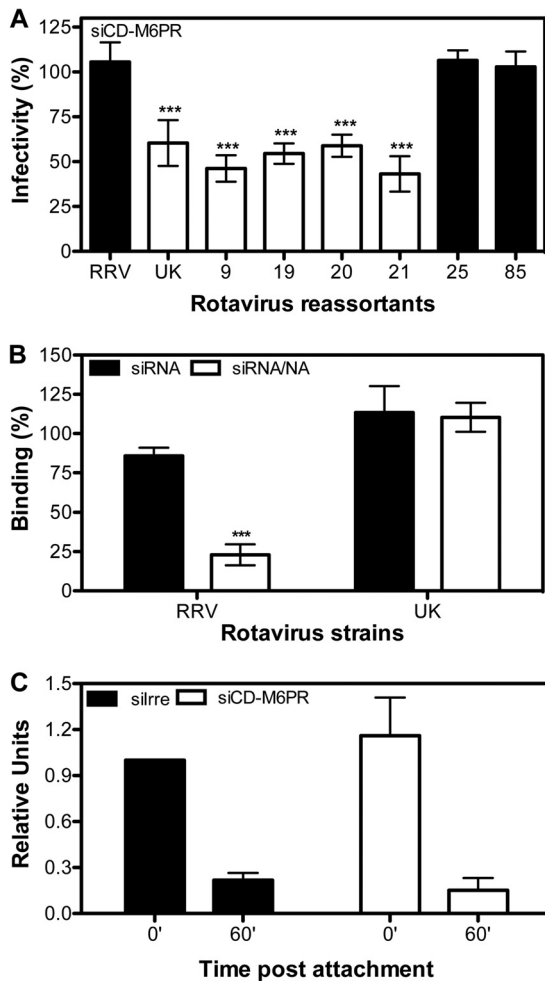


FIG 3 Infectivities of UK \times RRV reassortants in CD-M6PR-knockdown cells. (A) MA104 cells transfected with an siRNA against CD-M6PR (siCD-M6PR) were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hpi, the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the level of infectivity of cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% infectivity. Black bars, RRV and reassortants bearing RRV VP4; white bars, BRV UK and reassortants bearing BRV UK VP4. (B) Cell binding of the indicated virus was determined in MA104 cells transfected with an siRNA against CD-M6PR and treated or not with neuraminidase (NA), as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of virus binding compared with that observed in cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100%. Panels A and B show the arithmetic means \pm standard deviations of at least three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between cells treated with NA and mock-treated cells. ***, $P < 0.001$. (C) MA104 cells transfected with an siRNA against CD-M6PR or with an irrelevant siRNA (Irre) were incubated with BRV UK TLPs (MOI = 20) for 1 h at 4°C. After this time, the unbound virus was removed by twice washing the cells with MEM, and the cells were either lysed (time zero min) or shifted to 37°C. After 1 h incubation, the viral particles still present at the cell surface were removed by washing with 3mM EGTA, and the cells were then lysed (time 60 min) as described previously (40). The total RNA was purified for qRT-PCR as described in Materials and Methods. Data on the amount of the VP6 gene negative strand detected were normalized to the amount of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA in cells transfected with an irrelevant siRNA. Data represent the arithmetic means \pm standard deviations of three independent experiments.

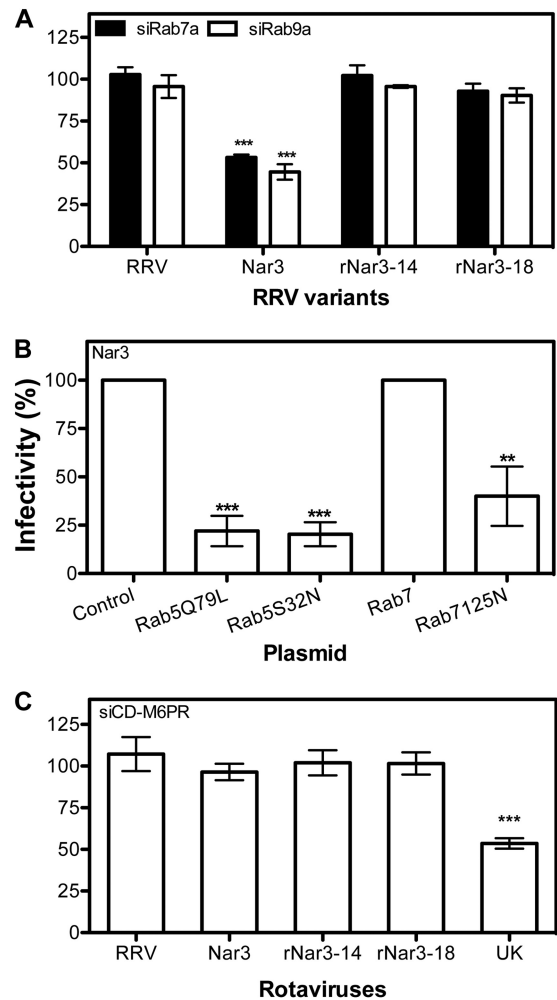


FIG 4 A single-residue change in VP4 associates with the late-penetrating phenotype of RV. (A) MA104 cells transfected with an siRNA against either Rab7a (siRab7a) or Rab9a (siRab9a) were infected with Nar3 or its revertant viruses (rNar3-14 and rNar3-18) at an MOI of 0.02. At 14 hpi, the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. (B) MA104 cells were transfected with plasmids encoding the wild-type form of Rab7 and the mutant versions of GTPases Rab5a (Rab5Q79L and Rab5S32N) and Rab7a (Rab7125N) and incubated for 24 h. The cells were then infected with Nar3 at an MOI of 5, and at 6 hpi they were fixed, processed for immunofluorescence assay, and analyzed by confocal fluorescence microscopy as described in Materials and Methods. The infectivity of Nar3 in cells expressing the mutant versions of the indicated GTPases was obtained by normalizing against the infectivity observed in cells expressing the respective wild-type version or, in the case of the Rab5 mutant, against the infectivity observed in cells transfected with the empty vector, which in both cases represents 100% infectivity. (C) MA104 cells transfected with an siRNA against CD-M6PR were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hpi, the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. In panels A and C, data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the level of infectivity of cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% infectivity. For all the panels, the arithmetic means \pm standard deviations of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

(Fig. 4C). Altogether, these results indicate that even though Nar3 reaches late endosomal compartments during the cell entry process, as BRV UK does, it does not require the expression of CD-M6PR, a factor required for BRV UK infection.

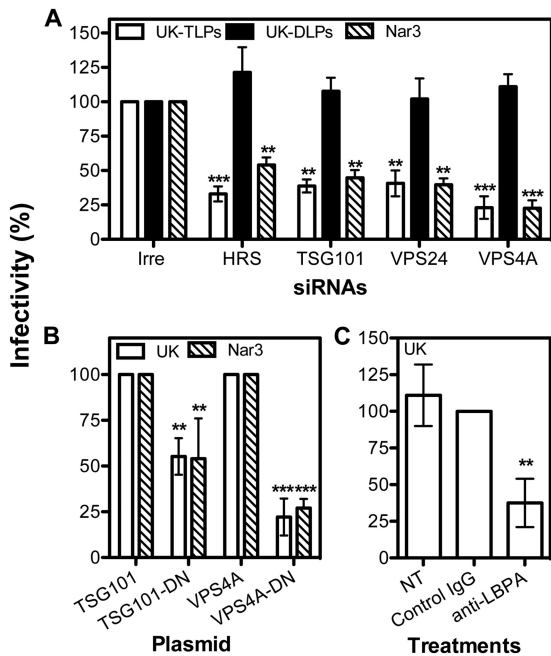


FIG 5 ESCRT machinery and ILV formation are required for the cell entry of BRV UK. (A) MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs and at 72 hpt were infected with BRV UK or Nar3 at an MOI of 3 or lipofected with BRV UK DLPs. At 6 hpi, the cells were fixed and processed for an immunofluorescence assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of the virus compared to that observed in cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% infectivity. (B) MA104 cells were transfected with plasmids encoding wild-type or mutant versions of ESCRT protein TSG101 (TSG101-DN) or VPS4A (VPS4A-DN). At 24 and 48 hpt, respectively, the cells were infected with BRV UK or Nar3 (MOI = 5), and at 6 hpi, the cells were fixed, prepared for immunofluorescence assay, and analyzed by confocal microscopy as described in Materials and Methods. Virus infectivity in cells expressing the mutant versions of the indicated ESCRT proteins was obtained by normalizing against the infectivity observed in cells expressing their respective wild-type protein, which represents 100% infectivity. (C) MA104 cells were mock incubated (no treatment [NT]) or incubated with 50 μ g/ml of either antibody to LBPA (anti-LBPA) or a control IgG isotype antibody (Control IgG) for 16 h. Cells were then inoculated with BRV UK at an MOI of 5 for 1 h at 4°C in the presence of the respective antibody before they were washed twice and incubated in MEM at 37°C for 6 h. Cells were fixed and processed for immunofluorescence assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of BRV UK compared to the level of infectivity of cells incubated with a control isotype antibody, which represents 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations of three independent experiments performed in duplicate are shown. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

ESCRT and the formation of ILVs are important for cell entry of late-penetrating rotaviruses. The involvement of ESCRT and ILV formation in the cell entry of RV strains RRV, Wa, and DS-1 was recently reported (40). Thus, in this work we also evaluated if this complex is required by the L-P RV strains UK and Nar3. MA104 cells were treated with siRNAs targeting the proteins HRS, TSG101, and VPS24, members of the ESCRT-0, -I, and -II complexes, respectively, and the ATPase VPS4A, whose function is essential for the scission of ILVs in maturing endosomes to generate multivesicular bodies (MVBs) (24). The infectivity of RVs UK and Nar3 in MA104 cells in which the ESCRT components were silenced decreased by more than 60% compared with that in cells transfected with an irrelevant siRNA (Fig. 5A); these siRNA treatments had no effect on the infectivity of lipofected,

transcriptionally active DLPs (shown for BRV UK in Fig. 5A), suggesting that the ESCRT machinery participates in BRV UK infection at the cell entry level.

To confirm the results obtained with the RNAi approach, we tested the effect of overexpressing DN mutants of the ESCRT proteins TSG101 and VPS4A on Nar3 and BRV UK infectivities. MA104 cells expressing the mutant version of TSG101, TSG101-DN, which lacks the ability to interact with other components of the ESCRT-0 complex (50), showed a 45% decrease in infection with both viruses (Fig. 5B), while the overexpression of the functionally impaired VPS4A mutant, VPS4A-E228Q (50), decreased the infectivity of the Nar3 and UK viruses by more than 70%, suggesting that the ESCRT formation of ILVs is required for these viruses to enter cells. This conclusion is supported by the fact that an antibody blocking the phospholipid lysobisphosphatidic acid (LBPA), which is crucial for ILV formation, inhibited the infectivity of BRV UK by more than 60% compared to that of cells exposed to a control IgG (Fig. 5C).

Rotavirus colocalization with intracellular traffic components. To further characterize the entry process of RV strains UK and Nar3, we analyzed by confocal microscopy the colocalization of the incoming virus particles with the ESCRT protein HRS, the endosomal markers EEA1 and Rab7a, as well as the GTPase Rab9a. For this, MA104 cells were incubated with the indicated virus for 1 h at 4°C, washed, and shifted to 37°C for the indicated periods of time (Fig. 6). The cells were then fixed, incubated with the specific primary and secondary antibodies, and processed for confocal microscopy. Viruses, EEA1, and Rab GTPases were detected by indirect immunofluorescence, while HRS was detected directly in cells that were transfected with a plasmid encoding a fusion of HRS and the cyan fluorescent protein (HRS-CFP). Both viruses were found to colocalize with all the cellular molecules assayed (Fig. 6A and B). The times required to achieve the maximum signal and percent colocalization are shown in Fig. 6C. While both the UK and Nar3 viruses presented the same progression of colocalization with endosomal markers (HRS-EEA1-Rab7-Rab9), the kinetics appeared to be slightly dissimilar and were more apparent in the initial minutes. According to the maximum time required to achieve RV colocalization with the indicated cellular protein, RV mutant Nar3 reached the endosomal compartments earlier than the BRV UK strain. The colocalization of the UK and Nar3 viruses with the proteins HRS, EEA1, Rab7a, and Rab9a supports the participation of these proteins in virus entry.

Most rotavirus strains behave as L-P viruses. To characterize whether other RV strains behave as L-P viruses, the vesicular traffic of SA11-4S, Wa, WI61, DS-1, and YM, all of which enter cells by clathrin-mediated endocytosis (37), was evaluated. RRV was used as a control virus. The infectivity of these viruses was evaluated in MA104 cells in which the expression of Rab5a, Rab7a, and Rab9a was silenced by RNAi. As expected, the infectivity of all RV strains tested was significantly decreased in cells with knocked down expression of Rab5a (Fig. 7A). Of interest, the infectivity of RV strains Wa, WI61, DS-1, and YM was also significantly decreased in cells transfected with siRNAs against Rab7a (Fig. 7B), Rab9a (Fig. 7C), and CD-M6PR (Fig. 7D), while the infectivity of the clathrin-dependent simian strain SA11-4S (37) remained unaffected, as observed for the clathrin-independent strain RRV. These data suggest that, with exception of RRV and SA11-4S, all other RV strains need to reach late endosomes and depend on the function of Rab9 and CD-M6PR to infect the cell. These results

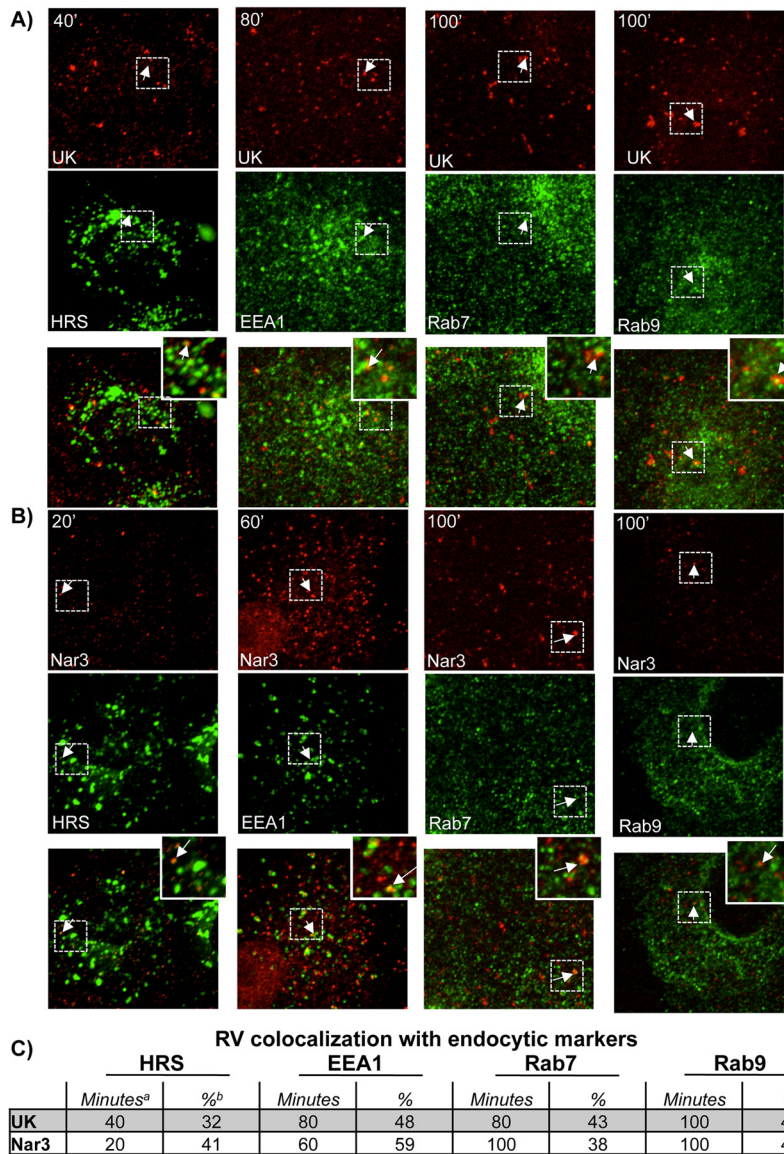


FIG 6 Colocalization of RV particles with ESCRT components and markers of the endocytic pathway. MA104 cells were incubated with purified BRV UK (A) or Nar3 (B) RV TLPs (MOI = 50) for 1 h at 4°C to promote virus attachment to the cell surface. The cells were then promptly shifted to 37°C, fixed at several times, as indicated, and processed for immunofluorescence assay. Virus particles were detected using anti-TLP primary antibodies and secondary antibodies labeled with Alexa 568. HRS was coupled to CFP; EEA1, Rab7, and Rab9 were detected with specific monoclonal antibodies and Alexa 488-conjugated secondary antibodies. Representative images are shown. (C) Times required to achieve the maximum signal and percent colocalization. ^a, data represent the maximum time (minutes postattachment) required to achieve RV colocalization with the indicated cellular protein; ^b, data represent the percent viral colocalization with the indicated cellular markers at the corresponding time points.

also suggest that there is not a direct correlation between the type of endocytosis used by the virus to enter the cell (clathrin dependent or independent) and the vesicular traffic followed afterwards.

Cathepsins are required for BRV UK cell entry. Since newly synthesized endosomal/lysosomal acid hydrolases are known to be delivered from the TGN to endosomes by M6PRs (53), we evaluated the potential role of cathepsins on the infectivity of BRV UK, which was used as a model strain for L-P RVs. Cathepsins are important components of lysosomes, and they are transported from the TGN to these organelles through LEs; in LEs the proenzyme is proteolytically processed into the active form, which is

then delivered to lysosomes (28). To test the role of cathepsins on BRV UK infection, we used specific inhibitors of the cysteine-acid proteases cathepsin B (CA-074) and cathepsin L (Z-FF-FMK), as well as leupeptin, a broad-spectrum inhibitor of endosomal/lysosomal proteases. We also tested the effects of these inhibitors on the infectivity of RRV, Nar3, and the revertant virus rNar3-14, since these viruses did not seem to depend on the CD-M6PR. As a positive control, we used reovirus type 3 Dearing (ReoT3D), since its infectivity is known to depend on the activity of cathepsins B, L, and S (56, 57). Leupeptin inhibited the infectivity of BRV UK by 40%, while it did not affect the infectivities of RRV, Nar3, and the revertant virus (Fig. 8A); as previously reported, the infectivity of

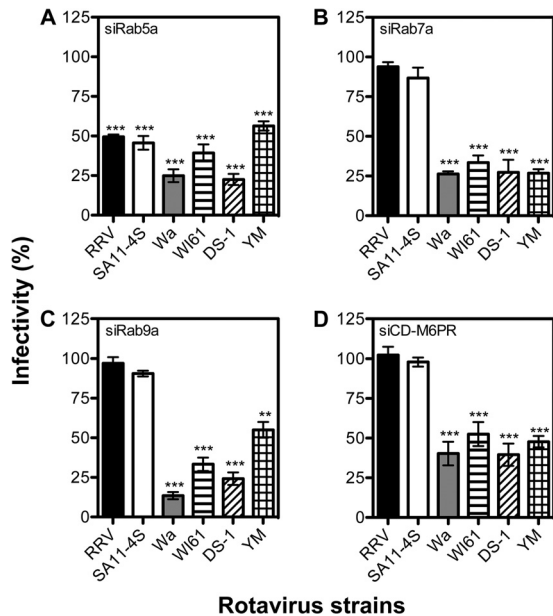


FIG 7 Evaluation of effects of vesicular traffic components on the infectivity of several RV strains. MA104 cells transfected with siRNAs against Rab5a (A), Rab7a (B), Rab9a (C), or CD-M6PR (D) were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hpi, the cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the level of infectivity of cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% infectivity. The arithmetic means \pm standard deviations of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivities of each virus in siRNA-transfected cells. ***, $P < 0.001$.

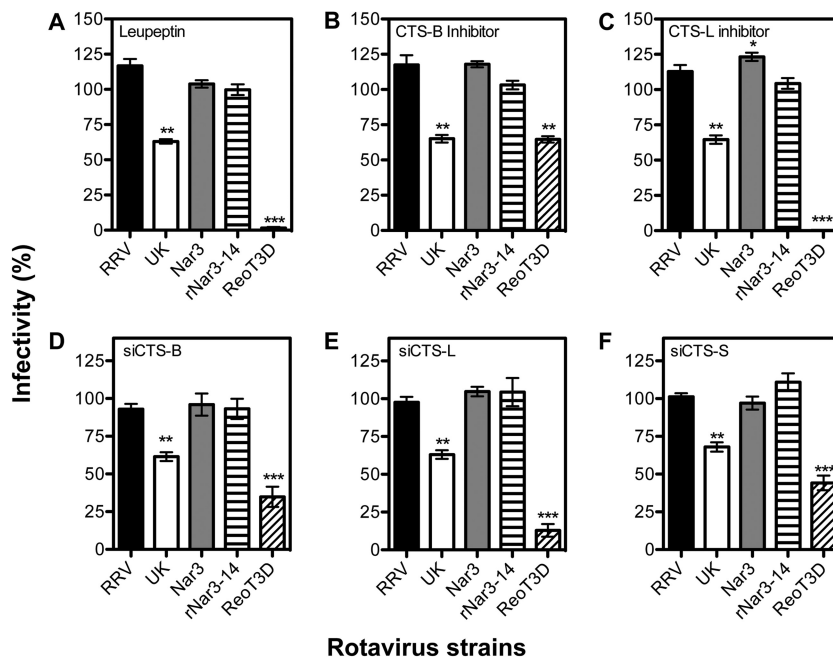


FIG 8 Role of cathepsins in RV infectivity. MA104 cells were treated or mock treated with leupeptin (A), the cathepsin B (CTS-B) inhibitor CA-074 (B), or the cathepsin L (CTS-L) inhibitor Z-FF-FMK (C) and infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 or 16 hpi (for assays with RV or reovirus, respectively), cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the infectivity obtained in mock-treated cells. MA104 cells transfected with siRNAs against cathepsin B (siCTS-B) (D), cathepsin L (siCTS-L) (E), or cathepsin S (siCTS-S) (F) were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hpi, cells were fixed and immunostained as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to their infectivity in cells transfected with an irrelevant siRNA. The arithmetic means \pm standard deviations of at least two independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivity of each virus under control and experimental conditions. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

ReoT3D was decreased by almost 100-fold. When the cathepsin-specific inhibitors were tested, we found that the inhibitor of cathepsin B decreased the infectivity of BRV UK and ReoT3D to about the same level (40%), while the infectivities of RRV, Nar3, and the revertant virus were not affected (Fig. 8B). The inhibitor of cathepsin L had the same effect on all RV strains as the inhibitor of cathepsin B, but it had a much more pronounced effect on the infectivity of ReoT3D (Fig. 8C). To confirm these results, we silenced the expression of cathepsins B, L, and S in MA104 cells by RNAi. Silencing the expression of these three cathepsins caused a reduction of BRV UK infectivity of about 40%, while the infectivity of RRV, Nar3, and rNar3-14 remained unaffected (Fig. 8D to F). The infectivity of ReoT3D under these conditions was somewhat similar to that of BRV UK, since it was decreased by about 60% with siRNA against cathepsins B and S (Fig. 8D and F) and about 80% with siRNA against cathepsin L (Fig. 8E). Altogether, these findings support a role of cathepsins on the infection of cells by BRV UK.

DISCUSSION

Regardless of the nature of the cell surface receptor used and the endocytic pathway employed for cell internalization (39, 40; this work), all RV strains seem to converge in EEs during cell entry, since their infectivities depend on the activities of Rab5 and EEA1 (Fig. 9). However, after EEs, the various RV strains apparently follow different routes to reach the cytoplasm. RRV and SA11-4S presumably exit the vesicular compartments from ME, as judged by the fact that their infectivities do not seem to depend on Rab7. On the other hand, the infectivity of RV strains UK (bovine), YM

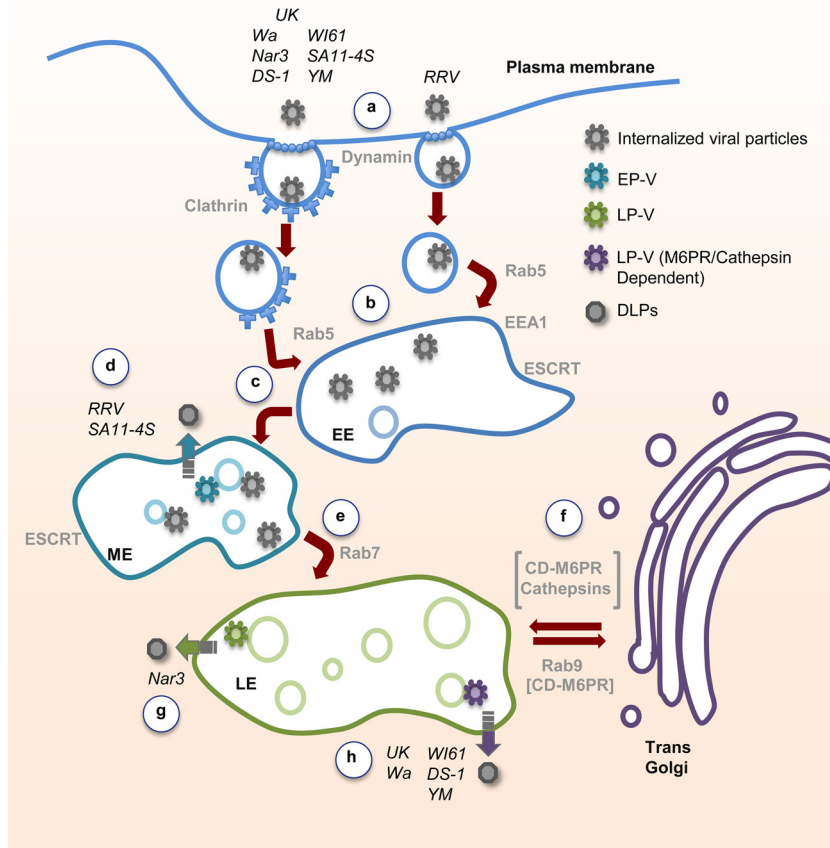


FIG 9 Rotavirus cell entry pathway in MA104 cells. (a) After multistep interactions with receptors and coreceptors on the plasma membrane, RV particles are internalized by either clathrin-dependent endocytosis or caveolin/clathrin-independent endocytosis, depending on the virus strain. (b) Primary vesicles containing RV particles fuse with EEs in an event orchestrated by the GTPase Rab5, which is dependent on EEA1, among other factors. The ESCRT machinery components are already present in EEs. After multistep interactions, all RV strains are delivered to EEs independently of the endocytic route of entry. (c) Maturation of EEs involves the formation of intraluminal vesicles by the ESCRT machinery, a process that is necessary for RV infection. (d) E-P RV strains (EP-V) RRV and, probably, SA11-4S reach the cytoplasm from MEs and do not require trafficking deeper into the cell. (e) GTPase Rab7 participates in the formation of LE compartments. (f) The stability and function of LEs depend on the arrival of cellular factors (e.g., cathepsins) from the Golgi apparatus, traffic that is mediated by M6PRs and the GTPase Rab9, among other factors (see the text). (g) L-P RV strains (LP-V) reach late endosomes; the infectivity of RV Nar3 from LEs requires the function of Rab9; (h) RV strains UK, Wa, WI61, DS-1, and YM require, in addition to Rab9, the function of the CD-M6PR and the activity of cathepsins to productively infect cells. The requirement of ILVs for RV infection is described in more detail in reference 40.

(porcine), Wa, WI61, and DS-1 (human), and Nar3, the NA-resistant variant of RRV, depends on the expression of this GTPase, suggesting that these viruses continue a deeper journey into the cell that depends on the ESCRT machinery (shown for BRV UK in this work and for human strains Wa and DS-1 in reference 40) to reach LEs. This late endosomal compartment likely provides the optimal environment for the Rab7-dependent strains to enter the cytosol. In this regard, Rab7-dependent RVs behave as late-penetrating (L-P) viruses (17), while simian RV strains RRV and SA11-4S can be considered early-penetrating (E-P) viruses (17). Of interest, all RV strains that reach LEs also require a functional Rab9a GTPase to infect the cell, and all of them, with the exception of Nar3, also require the activities of the CD-M6PR and cathepsins (Fig. 9).

The maturation process of LE involves a drop in luminal pH, the acquisition of lysosomal components, the exchange of membrane components, movement to the perinuclear area, a shift in choice of fusion partners, the formation of additional ILVs, and changes in morphology (26). As part of this maturation, proteins

traffic between the TGN and endosomes, and vice versa; the list of these proteins is expanding rapidly, as are their functions (reviewed in references 27, 58, and 59). The most characterized examples are the two types of M6PRs (27). M6PRs deliver newly synthesized lysosomal enzymes from TGN to endosomes and then return to the Golgi complex to bring more cargo. Two M6PRs have been described, the 46-kDa cation-dependent CD-M6PR and the 300-kDa cation-independent M6PR (CI-M6PR). Both types of M6PRs bind lysosomal enzymes, but they can also selectively transport other cargoes, such as insulin-like growth factor II and transforming growth factor β 1, among others (53). The fact that the infectivity of L-P RV strains decreases when the expression of CD-M6PR is silenced suggests that to exit LEs, these viruses need a cellular factor transported from the TGN to LEs by the CD-M6PR. One of the main cargoes of M6PR are cathepsins, proteases that mostly work at acidic pH.

Of interest, endolysosomal cysteine cathepsins are also required for reovirus capsid processing and infectivity (56, 57). The limiting step to begin the disassembly cascade of reovirus, once it

has reached the endosomal compartment, is the removal of the $\sigma 3$ protein by cathepsins B and L, which eventually leads to endosomal membrane rupture and delivery of transcriptionally active core particles into the host cell cytoplasm. Cathepsin S, a neutral pH cysteine protease, has also been shown to mediate uncoating of some reovirus strains in a macrophage cell line (60).

Cysteine cathepsins have also been involved in the entry of other viruses. It has been shown that the endolysosomal processing by cathepsins B and L of the Ebola virus glycoprotein is essential for delivery of viral material into the cytosol (61). Cleavage of the GP1 subunit of the virus spike glycoprotein by cathepsins reveals a putative binding domain for the endolysosomal cholesterol transporter Niemann-Pick type C1, which promotes virus fusion with the limiting membrane of LEs (62). Inhibitors of cathepsin L also prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry; it has been proposed that the viral glycoprotein is cleaved by cathepsin L, what activates the fusion of viral and endosomal membranes (63). Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells also seems to be mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment, which is a prerequisite for the production of infectious particles and for virus spread via cell-to-cell fusion (64).

In this work, we show that cathepsins B, L, and S are required for BRV UK infection but not for RRV or Nar3. Their precise role in RV entry remains to be determined, but on the basis of the observation of the role of these proteases in other virus systems, it is tempting to speculate that these endosomal proteases process one or the two virus surface proteins to promote the exodus of the DLP into the cytoplasm. As observed in the case of Ebola virus, the possibility cannot be excluded, however, that after the putative cathepsin processing of viral proteins there is an additional cell factor needed for the virus to leave the endosomal compartment (65). Of interest, the fact that the infectivity of Nar3 was dependent on Rab7 and Rab9 but independent of CD-M6PR suggests either that it does not need TGN cell components for infectivity or that the required component is transported by a different shuttle system (58). In this regard, it is of interest that the infectivity of Nar3 was not affected either by knockdown of the expression of cathepsins B, L, and S or by treatment with cathepsin inhibitors.

Given that CD-M6PR is required for the productive infectivity of most L-P RVs, the finding that Rab9a is also required is not surprising, since this GTPase resides predominantly in LEs and is required for the transport of M6PRs from endosomes to the TGN (66, 67). Thus, silencing the expression of Rab9 affects the retrograde transport of the CD-M6PR and, ultimately, the arrival to LEs of hydrolases and other Golgi apparatus components that might be required for RV infection. CD-M6PR has so far not been implicated in the cell entry process of any other virus.

UK \times RRV reassortant viruses were previously used to show that the clathrin-dependent or -independent endocytic pathways followed by BRV UK and RRV, respectively, were associated with the spike protein VP4, and it was also shown that a single amino acid change in VP4 dictated the route of entry (37). Remarkably, in this work we found that the dependence of BRV UK infectivity on Rab7, Rab9a, and CD-M6PR is also associated with VP4, since the presence of BRV UK VP4 correlated with the L-P phenotype of the reassortant. Furthermore, in this work we also showed that a point mutation in VP4 is able to convert RRV from a virus independent of Rab7 and Rab9 into a virus dependent on Rab7

and Rab9, since the RRV mutant virus Nar3, but not its revertant viruses, required the activity of these small GTPases for infectivity.

In addition to proteins transported by CD-M6PR from TGN to LEs, it is likely that factors such as acidic pH or the low luminal calcium concentration of endosomes could be part of the requirement for E-P and L-P RVs to get uncoated and exit the endosomal compartment. In this regard, it has been reported that preventing endosomal acidification with NH_4Cl and other weak bases does not block the infection of RRV (36, 38, 68, 69), but it reduces the infectivity of RVs UK and Wa (36), as well as the infectivity of those UK \times RRV reassortants bearing BRV UK VP4 (M. A. Díaz-Salinas et al., unpublished results). These findings support the idea that, in contrast to RRV, the L-P RVs UK and Wa could require the low pH of LEs to initiate viral replication in the cell. Regarding the role of endosomal calcium on RV entry, it is known that the *in vitro* stability of RV TLPs depends on the presence of calcium. If calcium is removed from the medium by chelation, the outer layer disassembles, yielding DLPs (70). Thus, it has been proposed that after virus entry by endocytosis, a drop in the luminal calcium concentration in the endocytic vesicle leads to virus uncoating, yielding a DLP that reaches the cytoplasm through a disrupted vesicle membrane (71). On the other hand, it has been shown that RRV uncoats *in vitro* at a calcium concentration of 10 nM, while BRV UK does it at 600 nM (70). Thus, one would expect that if the only trigger for the release of the outer capsid is the calcium concentration, as it decreases with the progressive maturation of the endosome (72), BRV UK would uncoat before RRV does. However, the results presented in this work show that RRV uncoats and likely reaches the cytosolic compartment from MEs, while BRV UK has to reach LEs, where the calcium concentration is even lower, before its exit to the cytoplasm. These observations suggest that RV uncoating in infected cells is an event more complex than that observed *in vitro* and most likely depends on a combination of factors, such as the interplay between pH and calcium concentration, as well as on cysteine proteases and possibly other uncharacterized protein cellular factors.

For RV strains RRV and UK and likely for most, if not all, RVs, the internalization (37) and the vesicular traffic of the virus during cell infection are associated with the VP4 protein (this work). Although the time and place as well as the specific factors that lead to virus uncoating have not been defined, it has been proposed that for this process to occur, the spike protein VP4 first has to undergo an initial conformational change, triggered by an unknown factor, that in turn promotes the release of the smooth VP7 surface layer in the endosome, converting the TLP into a DLP. This virus disassembly step is then believed to cause a more drastic rearrangement of the VP5 subunit of VP4 to a fold-back conformation that leads to the interaction of its hydrophobic domain with the endosomal membrane and disrupts it (9, 10, 73). Thus, the observation that RRV reaches MEs to infect the cell, while BRV UK and the other L-P RVs characterized in this work need to reach LEs, probably reflects the difference in the endosome luminal conditions required to induce the VP4 conformational changes of the different RV strains. Likewise, the fact that a single amino acid change in the VP4 protein of RRV changes the virus behavior from E-P to L-P most likely reflects the specific endosomal environment required for uncoating this virus.

Many enveloped viruses belonging to different virus families have been described to reach LEs during infection (17). However,

the vesicular traffic of nonenveloped viruses has been less characterized; mouse polyomavirus, simian virus 40, human papillomavirus, human rhinovirus, canine parvovirus, reovirus, and bluetongue virus have been reported to reach LEs (17, 74–76), although none of these viruses has been shown to depend on M6PRs for cell entry.

Despite the advances in the knowledge of the complete cell entry process of RV during cell infection that has taken place in recent years, there are still many questions that remain to be answered, including the possible existence of a so far unknown cell receptor that might play a major role during virus internalization; the role of pH and calcium concentration during cell entry; the place and time of virus uncoating and entry into the cytoplasm; the factors that trigger the conformational changes of VP4; the mechanism of viral permeation and/or disruption of the endosomal membrane; the possible cellular factor(s) of the TGN, other than cathepsins, that might be involved in the cell entry of L-P viruses; and the specific role of cathepsins in RV infection. Most importantly, it remains to be determined if all the events observed in cells of the MA104 cell line, the cell line most commonly used to study RV replication, occur in intestinal enterocytes during a natural infection. Whatever the answers might be, the findings presented in this work show that RVs are versatile, highly evolved entities that take advantage of different cellular processes to their benefit.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pedro Romero and Rafaela Espinosa for excellent technical assistance with cell culture, virus growth, and molecular biology methods and Andrés Saralegui for assistance with confocal microscopy.

This work was supported by grant 153639 from the National Council for Science and Technology—Mexico (CONACYT). D.S.-A. and M.A.D.-S. are recipients of a scholarship from CONACYT.

REFERENCES

- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565–572. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0905.020562>.
- López S, Arias CF. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309:39–66. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-30773-7_2.
- Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39:816–822.
- Espejo RT, López S, Arias C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156–160.
- Estes MK, Graham DY, Mason BB. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39:879–888.
- López S, Arias CF, Bell JR, Strauss JH, Espejo RT. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11–19. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90300-9](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(85)90300-9).
- Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70:5832–5839.
- Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430:1053–1058. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02836>.
- Yoder JD, Trask SD, Vo TP, Binka M, Feng N, Harrison SC, Greenberg HB, Dormitzer PR. 2009. VP5* rearranges when rotavirus uncoats. *J. Virol.* 83:11372–11377. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01228-09>.
- Trask SD, Kim IS, Harrison SC, Dormitzer PR. 2010. A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *J. Virol.* 84:1764–1770. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01682-09>.
- Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* 4:118–121. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb0297-118>.
- Grove J, Marsh M. 2011. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J. Cell Biol.* 195:1071–1082. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201108131>.
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62:317–329. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90369-P](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90369-P).
- Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH. 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine “fingers” and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* 270:13503–13511.
- Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* 149:901–914. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.149.4.901>.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 11:467–480. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.11.2.467>.
- Lozach PY, Huotari J, Helenius A. 2011. Late-penetrating viruses. *Curr. Opin. Virol.* 1:35–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.004>.
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:513–525. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2728>.
- Corvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. 1991. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64:915–925. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90316-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90316-Q).
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. 1992. The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70:715–728. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90306-W](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90306-W).
- Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, Marsico G, Nonaka H, Seifert S, Epstein-Barash H, Kuchimanchi S, Peng CG, Ruda VM, Del Conte-Zerial P, Hengstler JG, Kalaidzidis Y, Kotliansky V, Zerial M. 2012. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* 485:465–470. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11133>.
- Vanlandingham PA, Ceresa BP. 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J. Biol. Chem.* 284:12110–12124. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M809277200>.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122:735–749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>.
- Hanson PI, Cashikar A. 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28:337–362. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>.
- Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. 2011. The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21:77–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.
- Huotari J, Helenius A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30:3481–3500. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- Braulke T, Bonifacino JS. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:605–614. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.016>.
- Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* 1824:68–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>.
- Tsai B. 2007. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:23–43. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio.23.090506.123454>.
- López S, Arias CF. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12:271–278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.003>.
- Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV. 2012. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485:256–259. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10996>.
- Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, Morrow A, Jiang X. 2012. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* 86:4833–4843. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.05507-11>.
- Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, Castello AA, Jiang B, Jiang X. 2012. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction

73. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 30:408–416. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.322>.
74. Gold S, Monaghan P, Mertens P, Jackson T. 2010. A clathrin independent macropinocytosis-like entry mechanism used by bluetongue virus-1 during infection of BHK cells. *PLoS One* 5:e11360. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011360>.
75. Mainou BA, Dermody TS. 2012. Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection. *J. Virol.* 86:8346–8358. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00100-12>.
76. Anafu AA, Bowen CH, Chin CR, Brass AL, Holm GH. 2013. Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry. *J. Biol. Chem.* 288:17261–17271. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.438515>.